BAND XI
NEUE FOLGE
BAND V
LIEFERUNG 2
(SCHLUSSLIEFERUNG)

MIKROCHEMIE

Internationales Archiv für deren Gesamtgebiet

Redigiert von
W. BÖTTGER, Leipzig / **F. EMICH**, Graz / **H. EPPINGER**, Köln a. Rh. / **F. FEIGL**, Wien
H. LIEB, Graz / **H. MOLISCH**, Wien / **F. PREGL †**, Graz / **R. WASICKY**, Wien.

Unter Mitwirkung von:
E. Abderhalden - Halle, **H. V. Arny** - New York, **Y. Asahina** - Tokio, **G. Barger** - Edinburgh, **A. Benedetti - Pichler** - New York, **R. Berg** - Königsberg, **G. Bertrand** - Paris, **W. Biltz** - Hannover, **J. C. Bock**-Milwaukee, **E. M. Chamot**-Ithaca, **O. Dafert**-Wien, **G. Denigès**-Bordeaux, **J. Dubský**-Brünn, **R. Eder** - Zürich, **S. Edlbacher** - Heidelberg, **R. Ehrenberg** - Göttingen, **G. Embden** - Frankfurt a. M., **H. v. Euler**-Stockholm, **B. Flaschenträger**-Zürich, **E. Freund**-Wien, **A. Friedrich**-Wien, **O. Fürth**-Wien, **W. Geilmann** - Hannover, **W. C. de Graaf** - Utrecht, **H. Gravestein** - Delft, **H. G. Greenish** - London, **R. Grengg**-Wien, **F. L. Hahn**-Frankfurt a. M., **M. Haitinger**-Wien, **F. Haurowitz**-Prag, **K. Heller**-Prag, **L. van Itallie**-Leiden, **H. Jansch**-Wien, **S. Kakiuchi**-Tokio, **J. Kendall**-New York, **J. Kisser**-Wien, **G. Klein**-Heidelberg, **H. Kleinmann**-Berlin, **P. D. C. Kley**- Delft, **F. Knoop**-Tübingen, **L. Kofler**-Innsbruck, **J. M. Kolthoff** - Minneapolis, **G. Lunde** - Stavanger, **K. L. Maljaroff** - Moskau, **A. Martini** - Rosario, **A. Mayrhofer** - Wien, **L. B. Mendel** - New Haven, **A. Miolati** - Padova, **H. Molisch** - Wien, **J. M. Nelson** - New York, **J. B. Niederl** - New York, **W. Nonnenbruch** - Prag, **F. Paneth** - Königsberg, **J. K. Parnas**-Lemberg, **V. Patzelt**-Wien, **W. Pauli**-Wien, **E. Philippi**-Innsbruck, **L. Pincussen**-Berlin, **D. Prianischnikow**-Moskau, **H. Přibram**-Prag, **K. Rast**-Leverkusen, **P. Rona**-Berlin, **L. Rosenthaler**-Bern, **O. Ruff**-Breslau, **H. Schmalfuß**-Hamburg, **E. Schmitz**-Breslau, **N. Schoorl**-Utrecht, **F. Schulz**-Jena, **C. Schwarz**-Wien, **Y. Shibata**-Tokio, **H. Siedentopf**-Jena, **E. v. Skramlik**-Jena, **D. D. van Slyke**-New York, **A. Soltys** - Graz, **E. Starkenstein** - Prag, **Z. Stary** - Prag, **W. Stepp** - Breslau, **J. Stoklasa** - Prag, **K. Thomas**-Leipzig, **J. Tillmans**-Frankfurt a. M., **A. Tschermak-Seysenegg**-Prag, **A. Tschirch**-Bern, **C. Urbach** - Prag, **A. Viehoever** - Philadelphia, **C. Weygand** - Leipzig, **H. Winterstein** - Breslau, **O. Wintersteiner**-New York, **F. Zaribnicky**-Wien, **R. Zeynek**-Prag.

Inhaltsverzeichnis

Originalabhandlungen: pag.

A. O. Gettler, J. B. Niederl and A. A. Benedetti-Pichler: The Isolation, Identification and Quantitative Determination of Ethyl Alcohol Normally Present in Human and Animal Tissues. With 9 figures . . . 167
H. Thurnwald and A. A. Benedetti-Pichler: Gravimetric Microanalysis of Beryllium Silicate Rocks. With 3 figures . . 200
R. A. Smith: Micro Vacuum Distillation. With figure 221
R. A. Smith: The Micro-Determination of Two Liquid Solubilities. The System Phenol-Water. With 3 figures 227
J. B. Niederl and Wm. J. Saschek: Micro Vapor Density Determination Method. Part I. On the Determination of Molecular Weight. With 4 figures 237
J. B. Niederl and Ida B. Routh: Micro Vapor Density Determination Method. Part II. On the Determination of Boiling Points. With 8 figures 251
J. B. Niederl and Br. Whitman: The quantitative, micro analytical Determination of Carbon and Hydrogen in an athmosphere of Nitrogen. With 4 figures 274
L. I. Weinstein and A. A. Benedetti-Pichler: A Distillation Method for the Rapid Determination of the Volatile Constituents of Small Samples of Copper-Zinc Alloys 301
H. M. Partridge and R. A. Smith: Use of the Photovoltaic Cell in Micro Acidimetry. With 6 figures 311
H. M. Partridge and J. A. C. Bowles: Micro Acidimetry of Nitrophenols with the Glass Electrode. With 4 figures 326
H. M. Partridge: A Zero Current Vacuum Tube Galvanometer. With 9 figures . . 337
R. H. Müller: Photoelectric Colorimetry V; Applications of the „Sperrschicht" Type Photoelectric Cells. With 7 figures and a plate . . 353

Sammelreferate:
J. Gicklhorn: Mikrophysik und Mikrochemie in der Biologie und Medizin. Mit 15 Textfiguren 369
M. Haitinger: Methoden der Fluoreszenzanalyse 429
Referate 465
Bücherschau 479
Varia 483

Mit 74 Abbildungen im Text, einer Tafel und zahlreichen Tabellen.

Mikrochemie erscheint in zwangloser Folge — in Lieferungen von verschiedenem Umfange.

EMIL HAIM & CO.
WIEN UND LEIPZIG
1932

Wir empfehlen beiliegenden Prospekt besonderer Beachtung

PAUL HAACK

Wien, IX./3, Garelligasse Nr. 4

Gegründet 1893

Telephon Nr. A-22-0-25 Postspark.-Konto 48.473

Alle Apparate für die quantitative organische Mikroanalyse

nach Prof. Pregl

Alle mikrochemischen Apparate und Behelfe

nach Prof. Emich

Behelfe zur Tüpfelanalyse

nach Doz. Feigl

Chemische und bakteriologische Apparate

Eigene Werkstätte für Glasbläserei, Ätzerei, Schleiferei und Laboratoriums-Utensilien

Die im vorliegenden Heft enthaltenen Originalia stammen aus der mikrochemischen Abteilung der New York University. Die Unterzeichneten begrüßen es mit Freude, daß die Mikrochemie eine Heimstätte an dieser Hochschule gefunden hat; sie entsprechen gern dem Wunsche der dortigen Mitarbeiter, die anläßlich der Hundertjahrfeier der New York University verfaßten Arbeiten in einem besonderen Heft zusammenzufassen, und sie verbinden damit den Wunsch, daß diese Disziplin an und mit der New York University in Amerika eine weitere gedeihliche Entwicklung nehmen möge.

Redaktion und Verlag
der
MIKROCHEMIE

ORIGINALIA.

THE ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETHYL ALCOHOL NORMALLY PRESENT IN HUMAN AND ANIMAL TISSUES*).

By

A. O. GETTLER, J. B. NIEDERL,

and

A. A. BENEDETTI-PICHLER.

Contribution from the Chemical Laboratories of the Washington Square College, New York University, and of the Chief Medical Examiner's Office, and Bellevue Hospital, New York City.

(Received January 14, 1932.)

At present it is still an open question whether or not ethyl alcohol is a normal constituent of human and animal tissues. The reason why the many workers in the field have not decided this question to date is that the normal alcoholic content of organs and tissues, if present at all, is extremely small. We shall show that steam distillates from organs contain at the most 0,0025% alcohol, and this small amount is intermixed with numerous other volatile compounds. There are no specific color or precipitation reactions for such dilute alcohol solutions, nor can the methods based upon physical constants be used, due to the extreme dilution, and the intermixture of other volatile organic substances.

Some of the earlier workers in this field, such as A. and J.

---

*) Shortened accounts of this work appeared in the Journal of the American Chemical Society, Vol. 54, p. 1476 (1932), and Zeitschrift für angewandte Chemie, Vol. 44, p. 457 and 458 (1931); for differences in the texts the one presented herewith may be considered as authoritative.

Bechamp[1], Rajewsky[2], Vitali[3], Albertoni[4], M. Nicloux[5], Landsberg[6], and Stocklasa[7] claimed that ethyl alcohol is present in tissues in very small traces; while Arnheim and Rosenbaum[8], Umber[9], and several others claimed that alcohol was absent in animal tissues. The reason for this disagreement lies in the fact that the above mentioned experimenters used tests which are not specific for ethyl alcohol; they oxidized the tissue distillates and then applied the Moore's, the Schiff's or the Nessler's reaction; or they tested the distillates directly with Lieben's iodoform, or Nicloux's sulphuric acid-chromate reagent. It is evident that each of these tests is given not only by ethyl alcohol, but also by many other substances. Due to the non-specificity of the tests neither of the two groups of workers should have made any claims as to the presence or absence of ethyl alcohol in tissues.

Although the presence or absence of ethyl alcohol in tissues and organs had not been decided, a number of investigators proceeded to determine quantitatively these unknown volatile substances found in all tissue distillates. The methods used by these workers were to distil the tissues and then determine the volatile substances therein as iodoform, or by titrating with standard chromic acid, or by oxidizing to acid and then titrating the acidity produced by standard alkali. The results reported by them are as follows:

Ford[10]	in animal blood	0,0057%
Nicloux[11]	in entire guinea pig	0,001%
Landsberg[12]	in rabbit muscle	0,028%—0,083%

---

[1] Bechamp, A. and J., Compt. rend Acad. Sciences, **75**, 1830 (1872); **76**, 836 (1873); **89**, 573 (1879).

[2] Rajewsky, Arch. Physiol., Z, 122 (1875).

[3] Vitali, Ann. di Chim. e di farm., Series 4, **6**, 250 (1887).

[4] Albertoni, Ann. di Chim. e di farm., Series 4, 6, 250 (1887).

[5] Nicloux, M., Compt. rend. Acad. Sciences, Series **10**, **3**, 841 (1896).

[6] Landsberg, G., Ztschr. physiol. Chem., **41**, 505 (1904).

[7] Stocklasa, Deut. med. Wchschr., **6**, 198 (1904).

[8] Arnheim, J., and Rosenbaum, A., Ztschr. physiol. Chem., **40**, 220 (1904).

[9] Umber, Ztschr. f. klin. Med., **39**, 12 (1900).

[10] Ford, Journ. Physiol., **34**, 430 (1906).

[11] Nicloux, These de Paris, 1900.

[12] Landsberg, G., Ztschr. physiol. Chem., **41**, 505 (1904).

MAIGNON[13])	in dog blood	0,016%—0,027%
PRINGSHEIM[14])	in entire rat	0,044%
„	in rabbit blood	0,018%
SCHWEISHEIMER[15])	in human blood	0,0368%

The methods used by the above experimenters are not specific for ethyl alcohol. It is common knowledge that the iodoform reaction is given by several volatile organic substances. The chromic acid titration method depends upon a color change brought about by reducing action; and there are many volatile organic substances other than ethyl alcohol that will reduce chromic acid. The method based upon oxidation and then titrating the acidity produced is also not specific for ethyl alcohol; since the various alcohols and aldehydes will yield acidity on oxidation. GETTLER and TIBER[16]) have standardized this latter method, and by its use have obtained an average value of 0,00157% for human brains. They state, however, that this value simply means that if alcohol is present normally in human brains, the average amount is at the most 0,00157%.

From the foregoing resume of the literature it is evident that we have at present no answer to the question, "Is ethyl alcohol normally present in the human body?" TAYLOR[17]) in 1913, reported the finding of traces of ethyl alcohol in dog muscle. He identified the alcohol by making the ethyl-p-nitro benzoate derivative.

Since there is no specific test for ethyl alcohol in such traces as may be present in organs and tissues, the only possibility of confirming its presence was to isolate the ethyl alcohol in absolutely pure form; next to determine the boiling point of the pure isolated material, determine its carbon content quantitatively, and prepare some derivatives from it, such as ethyl benzoate and ethyl iodide, and finally determine the boiling point of these derivatives. Since we expected to find such small traces as 0,015 g. ($^1/_3$ of one drop) of ethyl alcohol in the entire brain (weighing 1500 grams) micro-chemical methods had to be selected and devised.

---

[13]) MAIGNON, F., Compt. rend. Acad. Sciences, **140**, 1063 (1905).

[14]) PRINGSHEIM, J., Biochem. Ztschr., **12**, 143 (1908).

[15]) SCHWEISHEIMER, Deut. Arch. f. Klin. Med., **109**, 271 (1912).

[16]) GETTLER and TIBER, Arch. Path and Clin. Med., **3**, 75 (1927); **3**, 218 (1927).

[17]) TAYLOR, A. E., Journ. Biol. Chem., **15**, 217 (1913).

The fractional distillation.

The object was to isolate absolute alcohol from large volumes (several liters) of extremely dilute (0,001%) ethyl alcohol solutions by fractional distillation.

A. Concentrating with special distilling flasks.

In the study of the distillation of extremely dilute alcohol solutions, we found that the first ring of condensate contains most of the alcohol present. We also found that quite an appreciable part of this alcohol can be lost if an ordinary distilling flask is used.

In order to avoid any losses, specially constructed distillation flasks (Fig. 1) were used. Condenser, flask and filling tube (c) are in one piece. No stoppers are needed thus doing away with dead spaces at top of flask and top of condenser. The flask is filled through (a) by means of funnel. Tube (b) serves as a syphon for emptying the flask. In order to avoid any evaporation from within the condenser, the latter is rinsed with water just before starting the distillation. Four sizes, 1000 cc., 500 cc., 100 cc. and 60 cc., of these distillation flasks were used in the fractionating. Bumping was avoided by adding about one gram of sodium bicarbonate to the liquid before starting distillation.

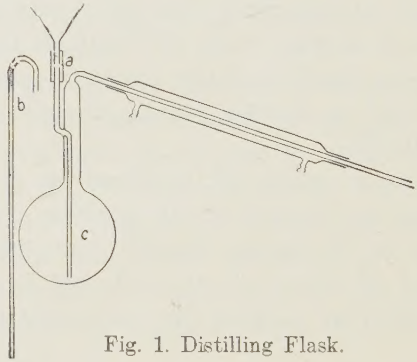


Fig. 1. Distilling Flask.

It was important to know how much of the dilute alcohol solution must be distilled in order to recover it quantitatively.

E. Donitz18) found that the alcohol is quantitatively recovered as follows:

---

18) Donitz, E., Maerker-Delbrueck, Spiritus-Fabrikation, 1908, p. 694.

from 0,08% solution if $^1/_{30}$ is distilled,
from 2,5% solution if $^1/_5$ is distilled,
from 12,5% solution if $^2/_5$ is distilled,
from 31,0% solution if $^1/_2$ is distilled,
from 62,0% solution if $^4/_5$ is distilled.

In other words, the more dilute the alcohol solution, the smaller the fraction to be distilled in order to recover all the alcohol.

M. NICLOUX and L. BANDNER[19]) state that for dilute alcohol solutions between 0,01% and 0,03% if $^1/_4$ of the volume is distilled all the alcohol is recovered.

M. J. STRITAR[20]) states that in solutions containing 1,5% alcohol or less, all the alcohol is recovered if $^2/_5$ of the volume is distilled.

This latter statement was confirmed by our own experiments. One liter of 0,002% alcohol solution was submitted to fractional distillation. Each fraction was tested for the presence of alcohol as follows: to five cc. of the distillate were added 2 cc. concentrated sulfuric acid and 2 drops of 0,1 N potassium permanganate. This mixture was heated to boiling. If alcohol is present the permanganate will be reduced and hence the violet color will disappear. The results are given in Table I.

Table I.

Amount of distillate necessary for complete recovery of small amounts of alcohol.

Fractions obtained on distilling one liter 0,002% alcohol	Vol. of each Fraction	Amt. of 0,1 N $KMnO_4$ added to 5 cc. distillate	Results
1	30 cc.	more than 5 drops	completely reduced
2	10 cc.	more than 5 drops	completely reduced
3	50 cc.	more than 5 drops	completely reduced
4	10 cc.	more than 5 drops	completely reduced
5	50 cc.	more than 5 drops	completely reduced
6	10 cc.	more than 5 drops	completely reduced
7	100 cc.	more than 5 drops	completely reduced
8	10 cc.	two drops	not reduced after 5 min.

To recover all the alcohol, 270 cc. (about ¼) of the original volume must be distilled.

---

[19]) NICLOUX, M., and BANDNER, L., Ztschr. analyt. Chem., **38**, 258 (1899).

[20]) STRITAR, M. J., Ztschr. physiol. Chem., **50**, 24 (1906).

The experiments in Table I indicate that if 270 cc. (about $^1/_4$) are distilled from one liter of 0,002% alcohol solution practically all the alcohol is recovered.

To further check the results obtained in Table I, the following quantitative experiment was performed:

A 0,06% alcoholic solution was made up. This solution was quantitatively analyzed by the micro silver iodide method, as described later. The solution was found to contain 14,6 mgs. of alcohol in thirty cc. of the solution.

Thirty cc. of this solution were then diluted to one liter, and then subjected to fractional distillation as follows:

from 1000 cc. distilled off 250 cc. (25%),
from 250 cc. distilled off 100 cc. (40%),
from 100 cc. distilled off 30 cc. (30%).

All the alcohol in the original 1000 cc. should now be present in this last 30 cc. of distillate. An analysis by the same micro method revealed the presence of 13,0 mgs. of alcohol. This indicates that on three fractional distillations of a liter of a 0,002% alcohol solution not more than 1,6 mg. is lost (90% recovery).

From the results of these experiments we have decided to concentrate the alcohol solutions by repeated fractional distillation, collecting 40% by volume each time, until the volume of the distillate containing the alcohol is reduced to about 5 cc.

B. Concentrating the alcohol by specially devised rectification flasks.

The repeated fractional distillation outlined above finally yields about 5 cc. of distillate containing between 0,02% and 2% of alcohol. Further fractional distillation involved almost entire loss of any alcohol present. Various forms and shapes of stills were tried. Experiments with a still head according to DUTTON[21]) indicated clearly the danger involved in the use of complicated apparatus. The alcohol distributing itself over the large surfaces of the condensing apparatus was entirely lost. An apparatus therefore was sought in which the condensing surface would be at a minimum.

---

[21]) DUTTON, J., Chem. Ind., 38, 1919.

Throughout this work it was noticed that the odor of alcohol was strongest when the first drop of condensate appeared. An apparatus was therefore devised to catch this first drop of condensate avoiding any distribution over large surfaces. This new device will be known as the "Rectification Flask".

The Rectification Flask.

The shape and dimensions of this flask are given in Fig. 2. It is made of Pyrex glass. Before using it must be thoroughly cleaned.

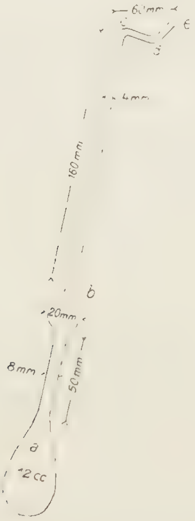


Fig. 2. Rectification Flask.

Five cc. of the solution to be distilled is now introduced. A small amount of zinc dust is added, to prevent bumping, and insure slow but regular boiling. If aldehydes are suspected of being present in the solution, sodium bicarbonate is substituted for the zinc dust. On boiling CO_2 is liberated and this helps the liquid to boil evenly.

The upper part of the rectification flask (from b to e) is now heated carefully with a small bunsen flame, in order to get the inside absolutely dry. When this part of the tube has again cooled to room temperature, a narrow strip of wet filter paper is wrapped around part d. It helps to keep this part cool. The distillation is now started.

The liquid in the bulb of the flask is heated with a small flame. The temperature should be raised slowly and regularly. A ring of condensate will be seen rising slowly up the stem of the flask. The moment it passes the knee (c) the flame is quickly removed. This ring of condensate collects as a drop at (d). This drop is immediately sucked up into a capillary tube, which is then sealed at both ends, and distillate therein reserved for further work. The whole apparatus is allowed to cool down to room temperature. When cool a second distillation can be conducted yielding a second drop fraction, then a third, a fourth and so on.

Distillations of 5 cc. portions of 0,5 % alcohol solution with this rectification flask, yielded the following results:

First	fraction —	6	cmm. —	B. Pt.	79,3° C,
Second	„	1,5	„	„	86,1° C,
Third	„	2,2	„	„	91,0° C.

Experiments of this kind indicated that one can start with a 0,5 % alcohol solution and the first drop of distillate yields a 79,3° C boiling point liquid. This is already alcohol of very high concentration. The subsequent fractions are poorer in alcohol.

C. Final fractionation of the alcohol by F. Emich's micro fractionating tube.

While working with the various distillates from human organs (section G and H) and after having removed therefrom all the volatile organic acids, volatile organic bases, and all aldehydes, it was found that the drop of concentrated distillate always contained acetone. Experiments were therefore conducted with mixtures of alcohol and acetone, using F. Emich's micro fractionating tube.

With Emich's micro fractionating tube, a drop and even fraction of a drop can be distilled (Fig. 3). It is made of Pyrex glass. The tube should be 65 mm. long, inner diameter 3 mm., the thickness of walls should not be less than 0,8 mm. The sealed end of the tube is drawn out to a glass rod, which serves to hold the tube while heating. At the bottom of the tube (b) asbestos is introduced: enough to absorb all the liquid to be distilled. In order to be absolutely dry, the asbestos must be heated just before introducing it into the tube.

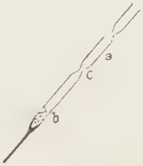


Fig. 3. **Emich**'s Micro Fractionating Tube.

The drop of concentrated distillate from section B is introduced into the asbestos of the micro fractionating tube. If any of the liquid adheres to the sides of the tube, it is forced into the asbestos by centrifuging. A strip of wet filter paper is wrapped around the tube at (a) between the two constrictions; this is for cooling purposes.

To start the distillation, the tube is held at an angle of 45 degrees, by the attached glass rod. A small Bunsen flame (15 mm. heigh) is then applied about 5 cm. below the part of tube (b) containing the asbestos. During the entire heating the tube must be continually rotated to get uniform heating. A ring of condensate gradually forms, and slowly ascends the tube. As soon as this ring passes the constriction (c) heating is stopped at once. The ring of condensate collects as a drop in part (a) of the tube. The distilled drop is at once taken up by a capillary tube, and used for the boiling point determination, or the tube sealed up at both ends and preserved for further work. The distilling tube with remaining liquid when cool again, is centrifuged, in order to bring any liquid adhering to sides, back into the asbestos again. Successive distillations are conducted in the manner just decribed, catching one ring of condensate each time, until no more liquid is left in the asbestos. Starting with 20 cmm. of alcohol-acetone mixture, 10—15 fractions could be obtained with this kind of tube.

Fractionating alcohol-acetone mixtures.

If the boiling points of alcohol-acetone mixtures are plotted against percent of alcohol present, a curve is obtained which deviates but slightly from a straight line. There is no indication of a maximum or minimum in the curve. We may expect therefore that there is no azeotropic mixture. Theoretically it should be possible to obtain a complete separation of ethyl alcohol and acetone by fractional distillation. We have made a number of fractionating experiments upon a mixture containing 8 cc. of ethyl alcohol, 2 cc. of acetone and 3 drops of water. The following is a protocol of one of our experiments on this question.

Twenty cmm. of the above-mentioned alcohol-acetone-water mixture were allowed to stand 3 days in contact with powdered anhydrous $CuSO_4$ in a sealed capillary tube. The dried alcohol-acetone mixture after removing the $CuSO_4$ was then fractionally distilled in the fractionating tube above described. The results are given in Table II.

Table II.

Boiling points of the various fractions obtained from an alcohol—acetone mixture.

Mixture Used	Boiling Points*)
80% alcohol — 20% acetone	66° C to 72,5° C
1st fraction	61° C to 66,5° C
2nd ,,	61° C to 68,5° C
3rd ,,	66,5° C to 73° C
4th ,,	66,5° C to 73,3° C
5th ,,	68,5° C to 75,5° C
6th ,,	68,5° C to 76° C
7th ,,	73° C to 77° C
8th ,,	73° C to 77,3° C

To isolate pure acetone and pure alcohol from the acetone-alcohol mixture, one would have to fractionate the lowest boiling fractions repeatedly. Due to the extremely small amount of material obtainable from tissue distillates this process is impossible. We can, however, use the boiling point figures of the series of fractions as a control for our work on the tissue distillates to follow.

---

*) see part E.

D. The micro drying of the isolated alcohol.

The concentrated drop or two of alcohol obtained by the above series of fractionating processes (b. pt. between 79° C and 83° C) is transferred into a capillary tube one end of which was formed into a little bulb Fig. 4 (a). The bulb was previously filled with finely granulated calcium oxide (anhydrous copper sulphate can also be used). The volume of the calcium oxide must be larger than the volume of the alcohol introduced. The capillary is then centrifuged, in order to force all the liquid into the bulb. The open end is then sealed (Fig. 4, b), and placed in a boiling water bath for five minutes. The capillary is now again centrifuged, to bring all the liquid into contact with the calcium oxide. Then it is allowed to stand three days at room temperature. The bulb end of the sealed capillary is now placed into the cavity of an aluminum heating block (Fig. 4, c). The temperature of the block is raised to 95° C and kept there for five minutes. The alcohol in the bulb portion thus distills and appears as a condensate in the part of the capillary, outside of the heating block. The capillary is now taken out of the block and is cut in two at the middle (Fig. 4, d). The part containing the condensate is centrifuged, in order to force the alcohol to the sealed end (Fig. 4, e). From here it may be taken out by a capillary tube (Fig. 4, f) and sealed for preservation, or used for boiling point and other tests.

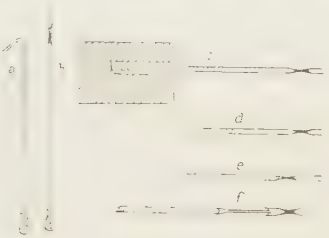


Fig. 4. Drying of the Alcohol.

E. The micro boiling point determination.

The method used for determining the boiling point of the droplets isolated from the tissues was that of F. Emich[23]).

A small drop (Fig. 5, B) is taken up by a capillary tube (about

---

[23]) Emich, F., Monatsh. Chem., **38**, 219 (1917).

1 mm. bore) (Fig. 5, A). The capillary is then sealed by bringing the tip of it into the edge of a Bunsen flame for a second. The walls of the capillary being extremely thin, fuse together almost instantly. Sealing in this way always leaves a bubble of gas (air) in the tip of the capillary, between the sealed portion of glass and the drop liquid (Fig. 5, C). This bubble of gas serves to prevent superheating of the liquid during the boiling point determination. The capillary containing the drop of liquid is then set up in an ordinary melting point apparatus (Fig. 5) (beaker, liquid bath, thermometer and stirrer). The temperature of the bath is now raised slowly and regularly. According to F. Emich the true boiling point of a pure liquid is the temperature at which the droplet in the capillary reaches the surface of the bath. This is true only, however, if the gas bubble in the tip of the capillary is so small that the effect of its expansion is negligible, and also that the temperature of the bath is raised regularly and uniformly throughout the entire bath.

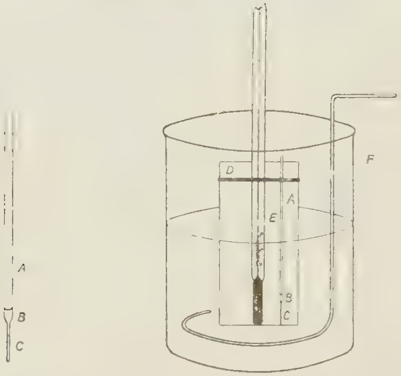


Fig. 5. Micro Boiling Point Determination (Emich).

We have tried experiments on the boiling point determination of especially purified anhydrous ethyl alcohol and found that the droplet starts ascending at about 75° C and reaches surface between 77,5° and 78° C. With specially purified water we found that the difference in temperature between the beginning of the ascent of the droplet and the arrival at the surface was only 1° C (99°—100° C). Micro boiling point determination with specially purified ethyl benzoate, showed a very large temperature interval (205—213° C) between beginning of rise and arrival at surface. This may have been due to residual ether (used in purifying) or to decomposition.

Boiling point experiments were tried with mixtures of two or more liquids. Only one of these will be described. A mixture of equal volumes of alcohol (boiling at 78,4° C) and acetone (boiling at 56,5° C) plus 5% of water, was used. On determining the boiling point of this mixture, it was found that the droplet of the mixture started ascending at 58° C, and reached the surface at 63,5° C (temperature range 58°—63,5° C).

Our experiments on the boiling point determinations of pure liquids, and also on mixtures of liquids, by Emich's method, indicated the following:

1. The boiling point of pure liquid (and one that does not decompose during the heating) is the temperature at which the droplet reaches the surface of the bath. The temperature range during the entire ascent is only about 1° to 2° C.

2. If the droplet is a pure liquid, but decomposition occurs during the heating, the temperature range during the ascent of the droplets is larger.

3. If the droplet is a mixture of two or more liquids, the temperature range during the ascent is also increased.

F. A micro method for the identification of ethyl alcohol by the preparation of the benzoate.

Ten mgs. of ethyl alcohol (about $^1/_5$ drop) were placed into a glass tube (10 cm. long and 3 mm. inner diameter) previously sealed at one end. An equal volume of benzoyl chloride was added. The liquids were mixed with a fine glass thread having a bead attached at its end. The tube was then corked and allowed to stand over night. The next day enough sodium bicarbonate was added to neutralize all of the benzoic acid and hydrochloric acid that was formed; a few drops of water were also added. Most of the sodium salts remain undissolved. The contents were mixed from time to time with the glass thread, until the odor of the benzoyl chloride disappeared, usually 3 to 6 hours. Enough ether was then added to give a layer of about 3 cm. in the tube. The tube was corked and contents well mixed. The tube and contents were then centrifuged. The supernatant ether layer was next transferred to another tube of the same type by means of a capillary siphon. Freshly dehydrated potassium carbonate was then added, enough to give a layer about 1 cm. high. The ether solution and potassium carbonate layer were then mixed with the glass thread, the tube was corked, and allowed to stand overnight.

The microfractionating tube (Fig. 3) with a small layer of asbestos (at b) was made moisture free by heating it in a small BUNSEN flame. When the fractionating tube was cold again, the ether layer mentioned above was transfered in several separate portions by means of a capillary tube into the asbestos of the fractionating tube. After the addition of each portion of the ether layer, the ether was evaporated by resting the fractionating tube on a lighted electric bulb. In this way it was possible to collect the ester quantitatively in the asbestos of the fractionating tube. Finally the fractionating tube was heated gently above a Bunsen flame, to remove the last traces of ether, avoiding any destillation of the ester at this time.

The ether-free ester within the asbestos was next fractionally distilled (see Sect. C). The middle and end fractions obtained were redistilled in the same manner. The last three fractions were used for boiling point determinations.

The micro boiling point determinations (as outlined in Sect. E) of the three fractions gave the following results:

	Rise of droplet
1st fraction	145°—205°
2nd fraction	190°—212°
3rd fraction	203°—212°
Pure ethyl benzoate	205°—213°

These experiments indicated that it was possible to produce ethyl benzoate from so small a quantity as 10 mgs. of ethyl alcohol, and confirm same by the micro boiling point determination.

G. Method for tissue distillation.

For human tissues, the liver and brain were used. Only such cases were selected that had been under observation in the hospital and in which we were positive that no alcoholic beverage nor medicines containing alcohol had been administered, nor had any alcohol rub been given for at least 15 days before death. The blood used was taken from laboratory workers who abstained from alcoholic beverages.

The pig brains were obtained directly from the slaughter house. As soon as the pigs were killed, the brains were removed and taken to laboratory. Work was commenced at once.

The dogs were kept in cages for two months. They were fed nothing but lean meat and water. For the analysis the brain, liver, and blood were utilized.

The tissues when removed from the body were at once put in clean glass containers and sealed up. They were placed in the refrigerator for about two hours. When ice cold they were ground up and 500 g. portions were placed in a liter distilling flask and 300 cc. of water added. This mixture was then subjected to steam distillation. A long well-cooled condenser with an attached adapter was used. The tip of the adapter dipped into a little ice cold water in the receiver. The latter was packed in ice. The distillation was continued until 500 cc. distillate had collected. The three 500 cc. distillates, each from 500 gms. of the same brain, or liver were combined. In some of this work composite samples were used. In these thirty, 500 cc. distillates from ten human livers (17000 g) were combined. The steam distillates were then fractionally distilled (without steam) three times: (1) from slightly acidified (H_2SO_4) solution, (2) from slightly alkaline (Na_2CO_3) solution, and (3) from neutral solution. These final distillates were then fractionated according to Sects. A, B, and C. In some of the experiments the original steam distillate was directly subjected to fractional distillation. In the case of dog brain, dog liver, and blood from living humans, where the material weighed much less than 500 gms., correspondingly smaller apparatus was used, and smaller distillates were collected.

H. The isolation and identification of ethyl alcohol from tissue distillates.

The tissue distillates used in these experiments are listed in Table VII. These distillates were fractionally distilled (according to Sec. A) several times, until the volume of distillate was reduced to about 80 cc. Some freshly prepared silver oxide was then added and the mixture allowed to stand several days. The unpleasant odor of the distillate disappeared upon this treatment (oxidation of the aldehydes present). The material without filtering was then distilled twice more, as described in Section A, until a distillate measuring about 4 cc. was obtained. This last distillate was now subjected to a fractional distillation by means of the rectification flask (Sec. B). Several fractions were obtained and the boiling point of each fraction determined. Since the series of boiling point determinations obtained in all our experiments were quite similar, only one series is given in Table III.

Table III.

Boiling points of the several fractions of alcohol—acetone mixtures from human liver.

fraction	volume	Range of temp. during rise of droplet	Boiling Point
1	22 cmm.	66°—75°	75° C
2	44 cmm.	71,2°—75,6°	75,6° C
3	45 cmm.	75°—77°	77° C
4	16 cmm.	78°—80,2°	80,2° C
5	35 cmm.	77,8°—79,8°	79,8° C
6	34 cmm.	78,8°—82,4°	82,4° C
7	22 cmm.	81°—84,4°	84,4° C

From the odor of the first two fractions, and from the behavior of the droplets in the boiling point determination (see Table II) we concluded that acetone must be present.

The presence of acetone was confirmed as follows: Parts of fraction No. 1 were used for the tests. A small amount of the fraction was treated in a capillary tube with a solution containing ammonium sulfate, ammonia, and sodium nitroprusside. A distinct violet color developed shortly.

Another portion of Fraction No. 1 was placed on a microscope slide. A solution of o-nitro-phenyl-hydrazine in dilute acetic acid was added. Long yellow needles of o-nitro-phenyl-hydrazone of acetone appeared.

The intermediate fractions (in which the temperature range for the rise of the droplet was 71° to 80° C) were combined into one, and dried.

The dried fraction, if very small, was used directly for boiling point, otherwise it was further fractionally distilled using Emich's micro distilling tube[22]) as outlined in Section C. Five to eight fractions were usually obtained. The boiling point of each fraction was determined. One of our series of such boiling points is given in Table IV. Micro boiling point determinations with pure anhydrous ethyl alcohol behaved exactly as did fractions 6, 7, and 8 isolated from human tissues. The boiling point of the purified and dried liquid isolated from tissues being between 78°—79° indicated that it was ethyl alcohol.

Table IV.

Boiling points of the several fractions of dried alcohol obtained from human liver.

fraction	Temp. range for rise of droplet	Boiling Point
1	69°—74°	74° C
2	69°—74°	74° C
3	68°—74°	74° C
4	70°—76°	76° C
5	71°—75°	75° C
6	75°—78,2°	78,2° C
7	75°—79°	79° C
8	76°—79,2°	79,2° C

The micro determination of the carbon content of the isolated ethyl alcohol.

The purified and perfectly dry fractions having boiling points between 78° C and 79° C were used. Quantitative analysis using F. Pregl's[24]) micro method, showed that the droplets of liquid isolated from tissues and boiling between 78° and 79° C, contained 51,8% carbon.

The theoretical carbon content of closely related substances is as follows:

---

[22]) Emich, F., Lehrbuch d. Mikrochemie, 2. Aufl., München (J. F. Bergmann), 1926.

[24]) Pregl, F., Quant. Org. Micro Analysis, 2nd Ed. (Blakiston) 1930.

Methyl alcohol	37,5%
Ethyl alcohol	52,1%
Propyl alcohol	60,0%
Acetone	62,1%

Since the pure liquid we isolated from tissues (boiling between 78° and 79° C) had a carbon content of 51,8%, it served as corroborative evidence that the isolated material was ethyl alcohol.

I. Identification of the isolated material as ethyl alcohol by making the ethyl benzoate derivative.

Isolated fractions, boiling between 77° C and 80° C were used. The method for preparation of ethyl benzoate as described in Section F was used. The benzoate obtained was fractionally distilled, using Emich's micro distilling tube, described in Section C. The boiling points of the various fractions were determined. Some of the boiling points of the benzoate derivative are given in Table V.

Table V.

Some of the micro boiling points obtained with the benzoate derivative.

Benzoate prepared from the isolated alcohol of	Range of temp. during rise of droplet	Boiling Point
Human liver	180°—204°	204° C
Human liver	190°—205°	205° C
Human liver	189°—207°	207° C
Human brain	190°—208°	208° C
Human brain	185°—205°	205° C
Human blood	191°—207°	207° C
Human blood	188°—206°	206° C
Dog blood	184°—205°	205° C
Dog blood	181°—202°	202° C
Benzoate made from ethyl alcohol	190—206	206° C
Benzoate made from ethyl alcohol	195—208	208° C
Pure ethyl benzoate	205—213	213° C

Although pure ethyl benzoate boils at 212° C, it was found that with the micro boiling point method as used in this work (see Sect. E) the boiling point values for the pure ethyl benzoate were 205°—213° C. The boiling points for ethyl benzoate made from pure ethyl alcohol were 190°—206° and 195°—208° C. Comparing these figures with those of the benzoate made from tissue distillates (see Table V) we find that they are quite similar, proving that the derivative made was ethyl benzoate. The ethyl benzoate was further identified by its odor, and by its insolubility in water. We have therefore in the production of ethyl benzoate a further corroboration that the liquid isolated from tissues is ethyl alcohol.

J. The identification of ethyl alcohol by means of the ethyl iodide derivative.

This method is based on the conversion of ethyl alcohol into ethyl iodide by the interaction with hydriodic acid.

$$C_2H_5OH + HI = H_2O + C_2H_5I.$$

The ethyl iodide was then isolated, purified and identified by its boiling point.

The apparatus.

The apparatus (Fig. 6) consists of a Kipp generator, the side-arm test tube C containing the distillate, and Pregl's ethoxy apparatus. The capillary outlet tube H, in this method is 14 inches long. The carbon dioxide necessary in the process passes through gas inlet tube A into the test tube C, the side arm D of which extends directly into the bulb E of the ethoxy apparatus con-

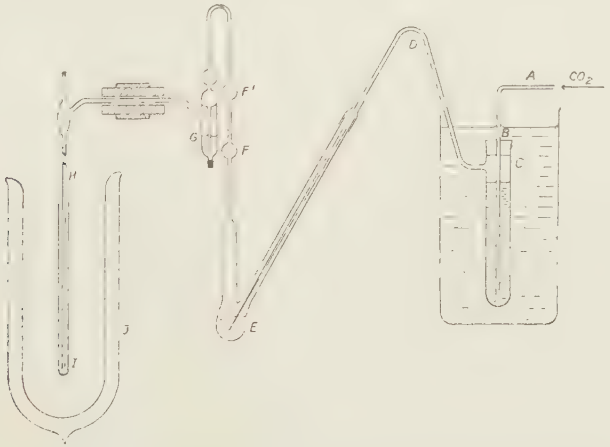


Fig. 6. Apparatus for the Isolation of Ethyl Iodide.

taining the hydriodic acid. The micro ethoxy apparatus consists in its essentials of the bulb E, the two condenser bulbs F, the gas washing arrangement G and the capillary outlet H, which extends into the receiver I. The latter is kept at a temperature of about — 80° C by a mixture of acetone and solid carbon dioxide in the Dewar flask J.

For the purification of the ethyl iodide obtained, EMICH's capillary siphon and centrifuge cone (Fig. 7) were employed, while for the determination of the boiling point of the purified ethyl iodide EMICH's micro boiling point apparatus (Fig. 5) was made use of.

The Method.

Five cc. of a concentrated aqueous distillate from tissues, after treatment with moist silver oxide (see Sect. A), was placed into the side arm test tube C containing 5 g. of anhydrous potassium carbonate. The latter lowers the vapor pressure of the water and also facilitates the separation of the alcohol. Connections were made immediately with the KIPP generator and the micro ethoxy apparatus, which was filled as follows: first, the 5% sodium thiosulphate and the 5% cadmium sulphate solutions were introduced into G by means of capillary pipettes. The purpose of the sodium thiosulphate is to absorb any iodine that might be liberated in the course of the experiment and the cadmium sulphate, to absorb any hydrogen sulphide or other volatile sulphides that may be present in the reagent or the reactant. Then 1,5 cc. of hydriodic acid, sp. gr. 1,70 (MERCK's special) was placed into the bulb D.

The ethoxy apparatus, the test tube C containing the distillate, the receiver I, and the DEWAR flask J are set up as in Fig. 6.

As soon as all the connections had been made and the apparatus found air tight the KIPP generator was opened so that 2—3 bubbles per second appeared in the washer G. The water bath into which the side arm test tube containing the alcohol distillate had been placed was now heated to boiling and kept so during the entire experiment. After the lapse of a few minutes (counted from the moment the KIPP generator was opened) the hydriodic acid in bulb E was heated to moderate boiling, such heating also being continued through the entire determination.

Soon after starting the experiment it was noticed that ice formed in the receiver I, which was kept at a temperature of about —80° C by the carbon dioxide-aceton mixture. After about 30—50 minutes, the determination was stopped, the receiver (I) which now contained a yellowish-white solid and on the bottom a heavy liquid was removed from the apparatus. As soon as the receiver attained room-temperature, the solid melted and settled on top of a drop or two of a heavy oil; the two liquids were not miscible.

Isolation and purification of the ethyl iodide.

It was found that the top layer was water, which was drawn off by means of a capillary siphon. The heavy oil was then transferred by means of a capillary pipet to a centrifuge cone (Fig. 7). A drop of distilled water was added and the mixture stirred by means of a fine glass thread. By centrifuging the mixture a clear separation was effected and the water layer on top was then drawn off. This washing procedure was repeated several times.

Fig. 7. Separation Ethyl Iodide-Water.

Identification of the ethyl iodide.

Boiling point capillaries according to **Emich** as shown in Fig. 5 were prepared and in each a portion (2—5 cmm.) of the purified ethyl iodide was introduced by means of capillary attraction. The end containing the ethyl iodide was then sealed. The boiling point capillary was then attached to a microscope slide and placed into the heating bath as illustrated in Fig. 5. The boiling point (see Sect. E) found was in all cases in close vicinity of the boiling point of pure ethyl iodide (72,3° C). The boiling points of some of the samples of ethyl iodide obtained are given in Table VI.

Table VI.

Some of the micro boiling points obtained with the iodide derivative.

Iodide prepared from the isolated alcohol of	Boiling pt. of the ethyl iodide
1. Human brain	71° C
2. Human brain	69° C
3. Human brain	71,5° C
4. Human liver	72,5° C
5. Human liver	71,8° C
6. Human blood	72° C
7. Human blood	71,9° C
8. Human blood	71,8° C
9. pig brain	54° C
10. pig brain	72,9° C
11. dog liver	neg.
12. dog liver	71,8° C
13. dog blood	71,5° C
14. dog blood	71,9° C
15. prepared from pure ethyl alcohol	72°—73° C

The boiling point of pure ethyl iodide is 72,3° C. The boiling points of the above preparations are all around this temperature indicating conclusively that the isolated iodide is ethyl iodide. The reason why the boiling points are all a little below the true boiling point of ethyl iodide may be due to slight impurities still present.

Corroborative evidence that the alkyl iodide prepared was ethyl iodide.

1. It is formed from a substance extremely soluble in water (ethyl alcohol is miscible with water in all proportions).

2. This substance distills from aqueous solutions below 100° C (B. Pt. of ethyl alcohol is 78° C).
3. It is formed by the interaction of hydriodic acid upon this substance (typical reaction of alkoxy compound).
4. Said compound cannot be:
   a) An aldehyde, as it would have been removed by the moist silver oxide;
   b) An acid, as it would have been kept back by the saturated potassium carbonate solution used;
   c) A base, as the HI used would prevent its volatilization;
   d) A ketone, as these types of compounds are not reacted upon under the experimental conditions.
5. The alkyl iodide isolated is water insoluble (ethyl iodide is very slightly soluble in water, 0,4%).
6. The alkyl iodide isolated gives reactions for both organic radicle and iodine.
7. The alkyl iodide isolated remained liquid at —80° C (F. Pt. of ethyl iodide — 112° C):
   methyl iodide F. Pt. — 62° C,
   methyl iodide mono hydrate — F. Pt. — 4° C,
   methyl iodide poly hydrate — F. Pt. + 5° C.
8. The boiling point of the isolated alkyl iodides was found to be between 69°—72,5° C,
   ethyl iodide boils at 72,3° C,
   methyl iodide 42° C,
   isopropyl iodide 89° C,
   n-propyl iodide 102° C,
   ethylidene iodide 177—179° C,
   iodo acetol 147—148° C.

Results of isolation and identification experiments.

Ethyl alcohol was isolated in a pure and anhydrous condition from brain, liver, and blood of humans, and of dogs, and from pig brains.

The various samples of ethyl alcohol isolated were identified by their boiling point.

From the isolated ethyl alcohol, ethyl benzoate was prepared, and identified by its boiling point.

From the isolated ethyl alcohol, ethyl iodide was prepared and identified by its boiling point.

The isolated ethyl alcohol gave the classical ZEISEL alkoxy reaction.

The tissues analyzed and results obtained are given in Table VII.

Table VII.

Tissues used for the isolation and identification of ethyl alcohol.

No.	Tissue	Weight	B. pt. of the isolated ethyl alcohol	B. pt. of the bezoate derivative	B. pt. of the iodide derivative	Zeisel alkoxy reaction
1	1 human brain . .	1.800 g	79° C	182°—204° C	71,5° C	positive
2	4 ,, ,, . .	6.300 g	77.9° C	190°—208° C	71° C	,,
3	1 ,, ,, . .	1.265 g	78,1° C	185°—205° C	68° C	,,
4	1 ,, ,, . .	1.225 g	77,8° C	180°—205° C	69° C	,,
5	1 ,, ,, . .	1.500 g	78,2° C	188°—207° C	71,7° C	,,
6	10 ,, livers . .	17.000 g	78° C	190°—206° C	—	,,
7	1 ,, ,, . .	1.225 g	78,2° C	180°—204° C	72,5° C	,,
8	1 ,, ,, . .	1.000 g	78,1° C	186°—205° C	71.9° C	,,
9	1 ,, ,, . .	1.180 g	77,8° C	190°—205° C	70,2° C	,,
10	1 ,, ,, . .	1.290 g	78,2° C	189°—207° C	70,8° C	,,
11	1 ,, ,, . .	950 g	77° C	185°—204° C	71,8° C	,,
12	1 ,, blood . .	25 g	77,8° C	182°—201° C	—	,,
13	3 ,, ,, . .	80 g	78,1° C	175°—190° C	69,9° C	,,
14	3 ,, ,, .	90 g	77,6° C	185°—204° C	71.8° C	,,
15	1 ,, ,, . .	150 g	78,7° C	191°—207° C	72,1° C	,,
16	1 ,, ,, . .	45 g	77,9° C	188°—206° C	71,9° C	,,
17	2 dog brains . . .	125 g	77,1° C	—	71,5° C	,,
18	2 ,, ,, . . .	155 g	77,6° C	182°—203° C	—	,,
19	2 ,, ,, . . .	145 g	77,5° C	185°—204° C	70,9° C	,,
20	2 ,, livers . . .	410 g	79,8° C	—	neg.	,,
21	2 ,, ,, . . .	520 g	77,6° C	183°—203° C	—	,,
22	2 ,, ,, . . .	440 g	78,9° C	—	71,8° C	,,
23	2 ,, blood . . .	350 g	77° C	180°—203° C	72° C	,,
24	2 ,, ,, . . .	420 g	78° C	181°—202° C	71,5° C	,,
25	2 ,, ,, . . .	490 g	77,2° C	184°—205° C	71,9° C	,,
26	300 pig brains . . .	28.000 g	—	—	54° C	,,
27	300 pig brains . . .	28.200 g	78,2° C	189°—206° C	72° C	,,

---

*) See section K.

K. Quantitative method for traces of ethyl alcohol.

The micro ZEISEL reaction[25, 26] for alkoxy groups was made use of. PREGL later devised an ingenious apparatus and method based on the principle of the ZEISEL reaction. Since then a number of investigators have studied all phases of this reaction and reported several improvements[27, 28, 29, 30, 31, 32, 33].

This method is based on the conversion of ethyl alcohol into ethyl iodide by the interaction of hydriodic acid.

$$C_2H_5OH + HI = H_2O + C_2H_5I.$$

The ethyl iodide is then quantitatively absorbed in alcoholic silver nitrate solution. An addition compound (AgI, $2AgNO_3$) precipitates immediately in the cold. The addition compound is then hydrolized by heating so that AgI is produced. The silver iodide is then quantitatively collected, dried and weighed. The calculation is based on the reaction:

$$AgI\,.\,2AgNO_3 \xrightarrow{H_2O} AgI + 2AgNO_3.$$

The method used in our work is based on the above outlined PREGL's micro ZEISEL method. We have, however, made some constructive changes in the apparatus as well as changes in procedure, such as in salting out, distillation and aeration, in order to be able to quantitatively determine ethyl alcohol in extremely dilute solutions (0,02% and less). The entire amount of alcohol being

---

[25] ZEISEL, S., Monatsh., **6**, 989 (1885).

[26] ZEISEL, S., and FANTO, R., Ztschr. f. landw. Versuchswesen, Österreich, **5**, 729 (1902); Ztschr. analyt. Chem., **72**, 549 (1903).

[27] PREGL, F., Quantitative Organic Micro Analysis (Blakiston, Phila.), 1930.

[28] BENEDETTI PICHLER, A., Fortschr. d. Mikrochemie, F. Deutike, Leipzig 1927.

[29] LIEB, H., and BENEDETTI-PICHLER, A., Mikrochemische Analyse, J. Springer, Berlin 1931.

[30] FRIEDRICH, A., Ztschr. physiol. Chem., **163**, 141 (1927); Mikrochemie, **VII**, 191 (1929).

[31] KIRPAL, A., and BUEHN, Th., Monatsh., **36**, 853 (1915).

[32] GATEWOOD and ROBINSON, Journ. chem. Soc. London, **1926**, 1966.

[33] WARE, G. M., Mikrochemie, **VIII**, 352 (1930).

between 0,1 mg. (as the lowest limit) and 1 mg. as the amount for which the method was standardized.

The apparatus.

The apparatus (Fig 8) consists of a Kipp generator for producing carbon dioxide, which latter is forced into A; the side arm test tube C which contains the solution to be tested; the test tube is stoppered by a one-hole rubber stopper through which passes the CO_2 delivery tube A reaching almost to the bottom of the test tube. The side arm D of the test tube passes all the way down into the bulb E, of the Pregl's micro ethoxy apparatus.

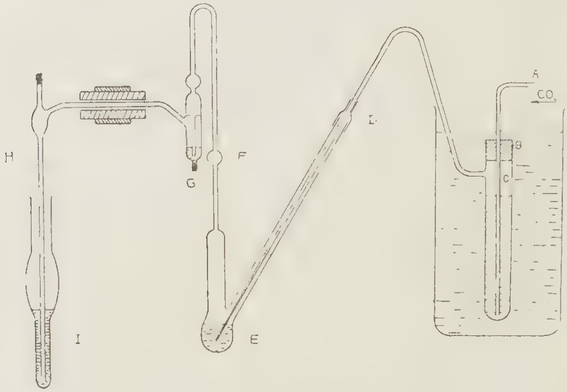


Fig. 8. Ethoxy Apparatus for Dilute Alcohol.

The ethoxy apparatus consists essentially of the aforesaid bulb E, condensor bulb F, the gas washing device G and the outlet tube H which latter extends into the receiver I.

For the quantitative collection and transfer of the silver iodide ultimately formed in the reaction, the micro halogen filtration and drying arrangement of Pregl (Fig. 9) were employed.

The quantitative micro method for ethyl alcohol.

The micro ethoxy apparatus was prepared first. Holding the apparatus in a horizontal position, about half cc. each of 5%

sodium thiosulphate solution and 5% cadmium sulphate solution are introduced by a capillary pipet into washer G through opening at bottom. The opening is then plugged up by a tiny cork. The sodium thiosulphate is added to remove any iodine liberated during the course of the experiment, and the cadmium sulphate for emoving hydrogen sulphide or any other volatile sulphides. Into the bulb E was placed 1,5 cc. of hydriodic acid, sp. gr. 1,70 Merck's special). The amount of hydriodic acid is about 2500 times the amount of alcohol expected to be present. Five cc. of tissue distillate were placed into the side arm test tube C, containing 5 grams of anhydrous potassium carbonate. The carbonate is added to lower the vapor pressure of the water, and also to facilitate the separation of the alcohol. Connections of various parts of the apparatus were then made (as per Fig. 8). The exit tube of the Kipp generator is connected to tube A, and the side arm of the test tube is introduced into the ethoxy apparatus, through the inlet tube D until the tip reaches well into the hydroiodic acid.

The hydroidodic acid in E was then heated to slow boiling. The receiver I, containing the specially prepared[34]) alcoholic silver nitrate solution (for the absorption of the ethyl iodide) was now set in place, so that the tip of the capillary outlet tube H dips almost to the bottom of the silver solution. Then the Kipp CO_2 generator was opened so that it delivered 2 to 3 bubbles of CO_2 per second into the receiver. The side arm test tube containing the material to be tested for alcohol was heated in a water bath, to facilitate the volatilization of the alcohol if present. The time and temperature when the first precipitate of the addition compound appeared, was noted. When no more precipitation occurred in the receiver, the above process was stopped.

The receiver containing the precipitated addition compound (AgI, $2AgNO_3$) was next removed from the set-up. One cc. of water and five drops of nitric acid were then added. The mixture was heated in a boiling water bath. This procedure hydrolyzed the addition compound, forming silver iodide in a nicely precipitated and filterable form.

---

[34]) 20 grams silver nitrate are dissolved in 500 grams of 95% alcohol. The solution is boiled 3—4 hours under reflux on a water bath. Reduced silver separates in a finely divided form. After standing 2 days, decant into dark stock bottle.

Silver iodide precipitate was now quantitatively transferred to the micro halogen filter tube (Fig. 9) prepared and filled according to PREGL[35]) by means of an inverted syphon. The precipitate in the filter tube was washed with alcohol. The filter tube containing the precipitate was then transferred to a micro heating block, and dried at 120° in vacuum using a suitable air filter. Drying is complete in about ten minutes. When constancy of weight was obtained, it was weighed on a micro chemical balance to within 0,01 mg.

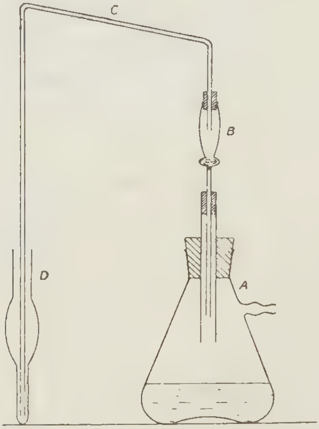


Fig. 9. Filtration by the PREGL Method.

Calculation.

Each mg. of AgI obtained in the reaction represents 0,196 mg. of ethyl alcohol.

FRIEDRICH[36]) has shown that under the experimental conditions the results are always low in the methoxy determination. He therefore advises a correction of 0,12 mg. AgI for its incomplete precipitation. Since the reactivity of ethyl iodide is but slightly less than methyl iodide, we have used the same correction.

---

[35]) PREGL, F., Quant. Org. Micro Analysis, 2nd Ed. (Blakiston) 1930.

[36]) FRIEDRICH, A., Ztschr. physiol. Chem., **163**, 141 (1927); Mikrochemie, **VII**, **191** (**1929**).

We ran a number of determinations on 5 cc. of 0,02% ethyl alcohol and found that additional correction was necessary for incomplete recovery of the ethyl alcohol from the 5 cc. of distillate. Under the experimental conditions this amounted to 0,153 mg. AgI[37]).

The total correction therefore to be added to the silver iodide obtained is 0,120 + 0,153 = 0,273 mg. AgI.

L. Quantitative determination of normal ethyl alcohol content in tissues.

The specimens listed in Table VIII were used in the analysis. Brains and livers of humans who had been under close observation for at least 15 days prior to death, were selected. We were positive that no alcoholic beverage, nor alcohol—containing medicine had been taken, nor had any alcohol rub been given. The human blood was taken from abstinent laboratory workers. The pigs' brains were obtained directly from the slaughter house. As soon as the pigs were killed, the brains were removed, put in glass jars, sealed, and taken to the laboratory at once. The dogs were kept in cages, fed nothing but fresh, lean meat, and water for about one month prior to their death. With the above precautions we were reasonably certain that our materials were from non-alcohol-drinking humans and animals.

The quantitative micro ethoxy method as described in sect. K was applied to distillates obtained (see sect. G) from tissues The results are tabulated in Table VIII.

By means of the quantitative micro ethoxy reaction it was found that the average content of ethyl alcohol in tissues is as follows: human brain 0,0004%, human liver 0,00256%, human blood 0,004%, dog brain 0,0003%, dog liver 0,0007% dog blood 0,0013%, pigs brains 0,00007%.

---

[37]) NIEDERL, J. B. and WHITMAN, B., Ztschr. analyt. Chem., 86, 65 (1931).

Table VIII.

Amount of ethyl alcohol present in normal tissues.

No,	Specimens	Tissue used in gm.	Vol. of Distillate in cc.	Ethxl alcohol present im mgs. per 1000 gms.	% Per Cent
1	1 human brain . .	1.800	1000	2,72	0,00027
2	4 human brains*) .	6.300	100	3,27	0,00033
3	1 human brain . .	1.265	200	5,45	0,00055
4	1 human brain . .	1.225	265	4,35	0,00044
5	10 human livers*) . .	17.000	240	7,56	0,00076
6	1 human liver . .	1.225	250	25,05	0,0025
7	1 human liver . .	1.000	250	39,90	0,0040
8	1 human liver . .	1.180	250	22,06	0,0022
9	1 human liver . .	1.290	270	55,35	0,0055
10	1 human liver . .	950	200	4,84	0.0004
11	1 human blood . .	25	100	45,31	0,0045
12	2 human blood*) .	55	100	47,1	0,0047
13	1 human blood . .	30	100	38.2	0.0038
14	1 human blood . .	25	100	32,4	0.0032
15	300 pigs' brains*) .	28.000	—	0,68	0,00007
16	2 dogs' brains*) .	125	75	3,30	0.0003
17	2 dogs' livers*) .	410	105	6,90	0,0007
18	2 dogs' blood*) .	350	100	13,70	0,0013

Corroborative evidence that the isolated substance is ethyl alcohol.

Aside from the conclusive identification of the ethyl alcohol, in other parts of this report, the following properties were noted during the quantitative ethoxy determination, which corroborate that the substance isolated and determinated is ethyl alcohol.

1. the compound must be extremely soluble in water, since not even if the solution is saturated with potassium carbonate does a turbidity appear (ethyl alcohol is miscible with water in all proportions);
2. it volatilizes from dilute aqueous solutions at temperatures below 100° C (ethyl alcohol boils at 78° C);
3. it forms a volatile alkyl iodide, boiling much below 127° C, the b. pt. of the hydriodic acid used in the experiments (ethyl iodide boils at 72,3° C);

---

*) Composite samples.

4. the alkyl iodide formed cannot be water soluble, as it would be held back in the washer of the apparatus (ethyl iodide is very little soluble in water, 0,4% at 20° C);
5. the alkyl iodide formed reacts with alcoholic silver nitrate solution in the cold (ethyl iodide does);
6. it must be a compound having an alkoxy group or grouping, as the method employed is a modification of a standard method for the determination of such groups (ethyl alcohol is hydrogen ethoxide);
7. other types of organic compounds (aldehydes, ketones, acids, or basic compounds) will not give an alkyl iodide under the experimental conditions, because:
    a) no difference in the result is observed whether the aldehydes were removed by moist silver oxide or not;
    b) acids will be held back by the saturated potassium carbonate solution employed, and any
    c) basic compounds by the hydriodic acid used, while
    d) ketones are indifferent.

Summary.

A technique was developed for isolating pure ethyl alcohol from extremely dilute alcohol solutions (,0025%) by newly devised fractional distillations.

Specially devised distillation flasks were used; the distillation flask and the condenser being in one piece, and no stoppers needed. This obviates absorption of volatile material within the stoppers. There are no dead spaces in the apparatus, avoiding losses of volatile substances due to such spaces in the ordinary distilling flask.

Specially devised rectification flasks were used when the volume of the distillate had been reduced to four cc. By means of the rectification flasks, one single distillation yielded a few drops of quite high proof alcohol, boiling around 79° C.

The alcohol isolated was then dried in one end of a sealed capillary by calcium oxide or by anhydrous copper sulphate. When perfectly dry it was distilled into the other end of the same sealed capillary, using an aluminium heating block.

The perfectly dry material was then taken from the capillary and introduced into Emich's micro-distilling tube and submitted to a final fractional distillation. Using this apparatus, one drop or even fractions of a drop can be distilled. By this means the acetone which is always present in tissues was separated from the ethyl alcohol. Other volatile substances, such as aldehydes, ketones, organic acids, and organic bases, were removed during the various above-mentioned procedures.

Micro boiling point determinations were made on the pure isolated ethyl alcohol for the purpose of identification.

By means of the technique outlined, pure anhydrous ethyl alcohol was isolated from human brains, human livers, human blood, dog brains, dog livers, dog blood, and pig brains. The amounts by volume isolated, ranged from one to ten cubic millimeters. The boiling points of the isolated specimens of the alcohol ranged between 77—79,8° C.

The ethyl alcohol was further identified by solubility and by the quantitative determination of the carbon content.

From the ethyl alcohol isolated from the tissues, the ethyl benzoate derivative was made, using a micro technique. The ethyl benzoate was identified by its boiling point, solubility and odor.

From the ethyl alcohol isolated from the tissues, the ethyl iodide derivative was made, using a micro technique based upon Pregl's alkoxy apparatus. The ethyl iodide was identified by its boiling point, freezing point, solubility and ultimate analysis.

The amount of ethyl alcohol present normally in the tissues was determined by a modification of Pregl's micro method, using the Zeisel reaction.

The average amount of ethyl alcohol present normally in the tissues analyzed is as follows: human brain 0,0004%, human liver 0,00256%, human blood 0,004%, dog brain 0,0003%, dog liver 0,0007%, dog blood 0,0013%, pig brain 0,00007%.

We present the following proofs that ethyl alcohol is a normal constituent of brain, liver and of blood:

1. Ethyl alcohol in a pure form was isolated from the tissues.

(a) The boiling point corresponded to that of pure ethyl alcohol.

(b) It was extremely soluble in water, as is ethyl alcohol.

(c) It gave the classical alkoxy reaction.

(d) It is not an aldehyde, ketone, organic acid, organic base because it would have been removed by the conditions of the experiments.

(e) The carbon content found agreed with the theoretical carbon content of ethyl alcohol.

(f) The boiling point and the carbon content ruled out all homologues of ethyl alcohol.

2. The ethyl benzoate derivative was made from the ethyl alcohol isolated from the tissues. It was identified by the boiling point, solubility and the odor.

3. The ethyl iodide derivative was made from the ethyl alcohol isolated from tissues. It was identified by the boiling point, freezing point, solubility and analysis for iodine and organic radical.

Conclusion: Ethyl alcohol was isolated and identified from brain, liver and blood of abstinent humans and also in a similar manner from organs of dogs and pigs.

pigs.

GRAVIMETRIC MICROANALYSIS OF BERYLLIUM SILICATE ROCKS.

THE SEPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF SILICIC ACID, PHOSPHORIC ACID, ALUMINIUM, IRON, BERYLLIUM, MAGNESIUM AND CALCIUM IN A SINGLE SMALL SAMPLE AND THE MICROANALYSIS OF THE MINERAL "KOLBECKIT".

By

HILDE THURNWALD and **A. A. BENEDETTI-PICHLER.**

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College of New York University, New York, N. Y.

(Received February 22, 1932.)

Introduction.

The largest part of the work reported in this paper was carried out by Dr. THURNWALD during my absence in the summer of 1931. It is therefore not more than just that Dr. THURNWALD be credited with having brought to a successful conclusion a very difficult task requiring continuous and careful attention. The surprising accuracy of the results must also be attributed to the more than ordinary skill acquired by her in the course of the lengthy investigation. It is also due to the fact that Dr. THURNWALD was able to devote her time exclusively to this kind of work.

It was found impossible to mention in the following all of the various preliminary experiments necessary to ascertain the proper procedure and conditions. Also the reasons why the original scheme proposed for the separation of the silicic acid was altered, may be seen from the literature on rock analysis and need no further explanation.

For the sake of brevity we are therefore forced to report merely the final successful experiments, referring as far as possible to previous publications[1] which give more detailed information as to the individual separations and determinations used in the present work.

I would like to point out, that this paper gives for the first time a well founded procedure[2] for a very complicated quantitative separation which can be started with only a few milligrams of sample. Every single step (separation or determination) has been tested separately and in combination with all of the previous operations which might influence it, so that practically nothing was left to chance or to assumption. Finally the procedure is shown in its application to the analysis of an actual silicate rock.

Accordingly the following description is divided into the paragraphs:

A. Separation and determination of beryllium and aluminium.
  a) The determination of beryllium as anhydrous sulfate without previous precipitation as hydroxide.
  b) The determination of beryllium as anhydrous sulfate after previous precipitation as hydroxide.
  c) The separation and determination of aluminium and beryllium.
B. Separation and determination of beryllium and magnesium.
C. Separation and determination of aluminium and magnesium.
D. Separation and determination of aluminium, beryllium and magnesium.
E. Separation and determination of phosphoric acid, aluminium, beryllium and magnesium.
F. Separation and determination of silicic acid, phosphoric acid, aluminium, beryllium and magnesium.
G. Analysis of a microsample of the mineral "Kolbeckit".
  a) Qualitative analysis.

---

[1] A. Benedetti-Pichler, Mikrochemie, Pregl-Festschrift (Wien 1929), p. 6; A. Benedetti-Pichler and F. Schneider, Mikrochemie, Emich-Festschrift (Wien 1930), p. 1; H. Thurnwald and A. Benedetti-Pichelr, Mikrochemie, IX, p. 324 (1931).

[2] I have already carried out complicated quantitative micro separations years ago. See F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie (München 1926), p. 158. But the methods used at that time were by far not so carefully tested, as the analyses were carried out on occasional request.

b) Solution of the mineral and determination of silicic acid, phosphoric acid, aluminium and beryllium.
c) Volumetric determination of iron.
d) Determination of calcium.
e) Determination of the water of hydration.
f) Results of the quantitative analysis.

The principle of "three weighings" and EMICH's technic[3] for filtration with an inverted filter (filterstick) were used exclusively in dealing with precipitates. The fact that relatively few analyses were lost due to accidents (such as clogged or leaking filter mats) and that good results were obtained throughout prove that this technic is peculiarly fitting and reliable for this type of work. Besides it may be mentioned, that the complete analysis of a silicate rock, comprising solution, determination of silicic acid and phosphoric acid, elimination of the molybdic acid, determination of aluminium, beryllium and magnesium can be carried out by one person in about one and a half days (14 hours work), assuming that apparatus and reagents are ready for use.

Thanks are due to Professor WILLIAM C. MAC TAVISH, Chairman of the Department of Chemistry, Washington Square College, New York University, for his interest in this investigation and for his kindness in placing laboratory facilities at our disposal.

A. A. BENEDETTI-PICHLER.

A. Separation and Determination of Beryllium and Aluminium.

a) The Determination of Beryllium as Anhydrous Sulfate without Previous Precipitation as Hydroxide.

A small microbeaker (9 mm. inner diameter, 35 mm. height and 1,8 cc. capacity) of Pyrex glass was thoroughly cleaned with chrom-sulfuric acid and distilled water. The outside was wiped off with wet flannel and chamois and the beaker then placed into the metal container (also previously rinsed with distilled water) of the heating block already described[4]. The temperature of the heating block was raised to 150° C. and then the beaker removed and placed in a clean porcelain crucible and cooled to room temperature in a desiccator in which potassium hydroxide and calcium oxide were used as drying medium. Of course, the beaker was not taken in the fingers but by forceps or other convenient device. After 20 minutes the beaker was placed in a small weighing bottle and weighed after standing 5 minutes in the open balance case.

---

[3] F. EMICH, Mikrochemisches Praktikum (München 1931), p. 62; F. EMICH-F. SCHNEIDER, Microchemical Laboratory Manual (Wiley, N. Y., 1932), p. 68.

Then 0,5 to 1 cc. of beryllium sulfate solution were measured out by means of a pipet into the beaker. The latter was again placed into the heating block and a gentle current of filtered air passed over the solution by means of a capillary tube. A small funnel was clamped in an inverted position a short distance above the opening of the beaker to keep off dust. The temperature of the block was slowly raised to 130° C. At this temperature the water has already been driven off. The air stream was now shut off, the capillary removed and the temperature raised slowly to 180° C. and then rapidly to 280° or 300° C. in order to drive off the sulfuric acid used in acidifying the beryllium sulfate solution.

After cooling to room temperature under a glass bell jar, the white residue was moistened with one drop of concentrated sulfuric acid and the acid evaporated as before. The treatment with sulfuric acid was repeated once more, this time the residue finally being heated for 15 minutes at 320° C. The beaker was then transferred into the desiccator. After cooling to room temperature (20 minutes) it was placed in the weighing bottle, which was closed immediately. After standing for 5 minutes in the open balance case it was weighed. (The weight of beaker and weighing bottle together is about 7 grams. The weighing bottle should always be kept in the balance case where it is protected from dust and kept at the proper temperature. For weighing a glass tare should be used.)

The anhydrous beryllium sulfate obtained by this procedure dissolves completely on standing with distilled water over night.

---

[4] A. BENEDETTI-PICHLER and F. SCHNEIDER, Mikrochemie, EMICH-Festschrift (Wien 1930), p. 7.

This shows that no basic sulfate is formed. Four determinations with 0,495 cc. beryllium sulfate solution gave the following results:

mg. $BeSO_4$ / 0,495 cc.	mg. BeO / cc.
2,314	1,111
2,330	1,119
2,348	1,128
2,326	1,118
Average:	1,119

Macro determinations were carried out with 100 cc. each of the same solution. In all cases the beryllium oxide was weighed directly. The results of 4 determinations were 1,118 mg., 1,080 mg., 1,090 mg. and 1,090 mg./cc. It must be mentioned, however, that by the turmeric test of Kolthoff[5] and the 1-2-5-8-tetrahydroxyanthraquinone test of Fischer[6] beryllium was found in the filtrates of the last 3 determinations in estimated quantities of about 1 to 2 mg. BeO / 100 cc. The figures cited must be corrected correspondingly.

The first two determinations were carried out according to Moser and Singer[7]. Aside from the fact that the precipitation was not complete in one case, both determinations gave at first too high results (1,20 to 1,30 mg. BeO / cc.) due to adsorption of silicic acid brought into solution by the reagents. Subsequent fuming with 1 drop of hydrofluoric acid and 0,5 cc. of concentrated sulfuric acid, igniting, standing over night in an atmosphere of ammonia and again igniting gave the figures listed above.

In order to avoid the danger of introducing silicic acid, the two last determinations were carried out by precipitating from an almost boiling solution with gaseous ammonia. Under these conditions the precipitation was not perfectly complete.

According to our experience the micro procedure described above seems to be the simplest and most rapid and reliable gravimetric method for the determination of beryllium.

In the slightly acidified beryllium sulfate standard solution, to which we will always refer later on, it was found in 4 micro determinations:

---

[5] I. M. Kolthoff, Journ. Amer. chem. Soc., **50**, p. 393 (1928).

[6] Helmut Fischer, Ztschr. analyt. Chem., **73**, p. 54 (1928).

[7] L. Moser and J. Singer, Monatsh. Chem., **48**, p. 673 (1927).

Volume of sample in cc.:	mg. $BeSO_4$ obtained:	mg. $BeSO_4 . 4 H_2O$/cc.
0,5	1,545	5,208
0,5	1,550	5,226
1,0	3,098	5,223
1,0	3,086	5,204
	Average:	5,215

b) The Determination of Beryllium as Anhydrous Sulfate after Previous Precipitation as Beryllium Hydroxide.

Either 0,5 cc. or 1 cc. of the standard beryllium sulfate solution were measured off with a pipet and then transferred into a microbeaker of "Fiolax" glass of 5 cc. capacity. The volume of the solution was brought to 1,5 cc. by addition of water. Then 3 drops of concentrated hydrochloric acid and one drop of an alcoholic solution of methyl red were added. The microbeaker was placed on the boiling water bath. A stream of ammonia-carrying air was then passed over the hot solution by means of a capillary tube[8], the end of which was about 1,5 cm. above the surface of the solution. A 10% ammonia solution was used as the source of ammonia. The stream of air was just strong enough to cause a depression in the surface of the liquid and was directed to one side of the beaker in order to cause a stirring of the solution. As soon as the solution became yellow the air stream was removed. The solution with the precipitate was heated a few minutes longer. It was then removed from the water bath and filtered while hot through a porcelain filterstick. The precipitate was washed twice with 0,5 cc. hot 1% ammonia solution. The filterstick was then disconnected from the suction flask but without removing from the beaker. The precipitate was dissolved by putting 0,5 cc. of dilute sulfuric acid (1 volume concentrated sulfuric acid: 3 volumes of water) into the beaker. Warming the contents of the beaker and agitating the acid with the filterstick will hasten the solution of the beryllium hydroxide. After a few minutes the solution was drawn off through the filterstick. The filtrate was caught in a small microbeaker of 1,5 cc. capacity and the original beaker and filterstick were rinsed twice with hot water (twice distilled) in order to collect the beryllium quantitatively. The total volume of solution plus wash water should not be greater than about 1,2 cc. The solution was then first concentrated by heating in the block to about 100° C. and passing a gentle current of air (from a water pump and filtered through cotton) over the solution. Then the air stream was removed and the temperature raised to 120° and finally to 280° or 300° C. The residue was treated as described above.

---

[8] See Mikrochemie, EMICH-Festschrift, p. 13 (1930).

Sometimes it happened that the residue of the first evaporation was yellow. This may be due to the adsorption of indicator by the beryllium hydroxide. In such cases in the first treatment of the residue with concentrated sulfuric acid a drop of concentrated nitric acid was also added in order to help destroy the organic matter. The final residues were perfectly white in all cases.

Results:

Sample: 5,215 mg. $BeSO_4 . 4 H_2O$/cc.:	obtained: mg. $BeSO_4$	expected: mg. $BeSO_4$	Difference:
0,5 cc.	1,580	1,547	0,033
0,5 cc.	1,586	1,547	0,039
1,0 cc.	3,125	3,094	0,031
1,0 cc.	3,132	3,094	0,038
		Average	0,035

The residues were on an average 0,035 mg. too heavy. In experiments in which a sample of 1,5 cc. pure water was treated in exactly the same way (blank test) the small microbeaker showed an increase in weight of 0,030 to 0,040 mg.

This shows that the high results are due to impurities brought into solution either by the reagents or given off into solution by the apparatus used (Fiolax beaker, filterstick). Since the reagents used had been carefully purified, we are inclined to believe that the impurities are due to the solvent action of the solution on the containers. In any case we were justified in correcting the weights of the residues actually obtained by subtracting the average difference 0,035 mg. as long as the same vessels, filtersticks and reagents were used.

The magnitude of the correction will, of course, vary with different conditions (apparatus and reagents). The surroundings in which the work is carried out may also influence the result. As long as the sources of such impurities are unknown, every analyst will have to determine the correction for himself and determine its constancy. It may be possible to eliminate the correction by using platinum vessels and platinum filter sticks exclusively in the determination of the beryllium. But even in this case a failure must be expected if the questionable impurities are due to matter adsorbed by the beryllium hydroxide precipitate. Considering the practical application it must not be forgotten that the main difficulty lies in the fact that the weighing form is the residue of a solution which has been obtained as the result of many previous separations in the course of a complicated investigation involving the use of many reagents.

Using the correction, the analyses cited above give the following results: 14,09, 14,16, 14,10 and 14,13% BeO in $BeSO_4 \cdot 4\,H_2O$. (Theory: 14,12%.)

c) The Separation and Determination of Beryllium and Aluminium.

It had been already shown by BENEDETTI-PICHLER and SCHNEIDER[9] that the separation of aluminium and beryllium by means of the oxyquinoline reagent also gives very satisfactory results with micro samples. But in these experiments only the aluminium was determined. The determination of the beryllium in the filtrate from the aluminium precipitation requires the previous elimination of the excess oxyquinoline reagent, which can be effected most simply by evaporating the solution to dryness and heating the residue with a mixture of concentrated sulfuric and nitric acid. A suitable procedure had to be developed. The following description shows its application in the course of the separation.

From 2 to 5 mg. of $KAl(SO_4)_2 \cdot 12\,H_2O$ were dissolved in 0,5 cc. of the standard beryllium sulfate solution in a microbeaker which had been previously weighed with its filterstick. One cubic centimeter of water and one drop of concentrated hydrochloric acid were added to the solution. Then the precipitation with 8-oxyquinoline was carried out as usual[10]. The yellow precipitate was filtered while hot and washed four times with 0,5 cc. hot water each. The precipitate was dried and weighed in the usual manner.

---

[9] Mikrochemie, EMICH-Festschrift, p. 10 (1930).

The filtrate and the wash water were caught in a microbeaker of Pyrex glass (5 cc. capacity). In order to evaporate the solution to dryness, the beaker was placed on a boiling water bath and a gentle current of air passed over the solution. From 3 to 5 drops of concentrated sulfuric acid were added to the brownish red residue and heating on the water bath was continued for a few minutes. A dark brown solution formed. The beaker was removed from the water bath and allowed to cool to room temperature. Then about 0,5 cc. (6 to 10 drops) of concentrated nitric acid were added in order to obtain a mixture containing about 2 parts of nitric acid to one part of sulfuric acid. Then the mixture was gently heated on the water bath until nitrogen oxides were no longer liberated.

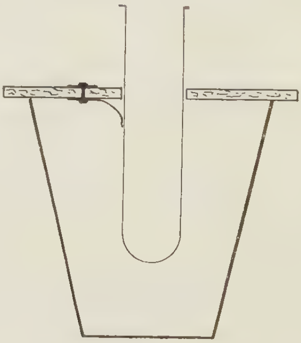


Figure 1.

The beaker was then transferred to an air bath (Fig. 1) consisting of a nickel crucible covered with an asbestos plate. There heating was cautiously continued until fumes of sulfuric acid appeared. After cooling to room temperature a portion of nitric acid (twice the volume of the residual sulfuric acid) was again added and the entire treatment repeated until the solution was perfectly colorless after driving off the nitric acid. Only one repetition was necessary in the majority of cases.

---

[10] A. BENEDETTI-PICHLER, Mikrochemie, PREGL-Festschrift (Wien 1929), p. 6.

Finally the temperature of the air bath was raised to about 300° C. in order to drive off also the sulfuric acid. The residue remaining was white. It was dissolved in 1,5 cc. of water and 3 drops of concentrated hydrochloric acid. Methyl red was added and the determination of beryllium as anhydrous sulfate with previous precipitation as hydroxide carried out as described above. The following results were obtained (the given weights of anhydrous beryllium sulfate are already corrected by subtracting 0,035 mg.):

Taken:		Obtained:			
mg alum:	mg. $BeSO_4 \cdot 4H_2O$:	mg. Al-ppt.:	mg. BeSO4:	% Al_2O_3 in alum:	% BeO in sulfate:
3,910	2,608	3,815	1,554	10,83	14,19
4.649	2.608	4,515	1,549	10,78	14,15
			Theory	10,77	14,12

B. Separation and Determination of Beryllium and Magnesium.

A sample of 1 to 5 mg. of $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ was weighed in a microbeaker of Fiolax glass. After dissolving in 1 cc. of distilled water 0,5 cc. of the standard beryllium sulfate solution, 3 drops of concentrated hydrochloric acid and one drop of an alcoholic methyl red solution were added. The beryllium was precipitated as hydroxide and weighed as anhydrous sulfate using the procedure described under Ab.

The filtrate and washings were collected in a microbeaker of Fiolax glass previously weighed together with its filterstick. The filtrate was concentrated to a volume of 1 cc. on the water bath. Then the solution was acidified by addition of one drop of concentrated hydrochloric acid. Finally the magnesium was precipitated and weighed according to BENEDETTI-PICHLER and SCHNEIDER (l. c.).

Results:

Taken:		Obtained:			
mg. $MgSO_4.7H_2O$:	mg. $BeSO_4.4H_2O$	mg. Mg-ppt.:	mg. $BeSO_4$:	% MgO:	% BeO:
1,515	2,608	1,510	1,549	16,37	14,15
5,030	2,608	5,010	1,552	16,36	14,17
			Theory	16,36	14,12

C. Separation and Determination of Aluminium and Magnesium.

It is necessary in the determination of magnesium in the filtrate from the aluminium precipitate to first destroy the excess oxyquinoline.

Alum and magnesium sulfate heptahydrate were weighed out in a microbeaker of Fiolax glass. The salts were dissolved in 1 cc. of distilled water. One drop of concentrated hydrochloric acid was added and the determination of the aluminium carried out according to Benedetti-Pichler (l. c.). The filtrate and washings were collected in a microbeaker of Pyrex glass and evaporated to dryness (water bath and stream of air). Then the oxyquinoline was destroyed by treatment with sulfuric acid and nitric acid as described under Ac.

The white residue finally obtained was dissolved in a few drops of hot water and the solution was transfered quantitatively (capillary syphon operating with suction similar to the device used in working with the filterstick) into a microbeaker of Fiolax glass previously weighed with its filterstick. The solution (and washings) was first concentrated to 1 cc. on the water bath. Then it was acidified by addition of 1 drop of concentrated hydrochloric acid and the magnesium precipitated and weighed according to Benedetti-Pichler and Schneider (l. c.).

Taken:		Obtained:			
mg. alum:	mg. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	mg. Al-ppt.:	mg. Mg-ppt.:	$\%Al_2O_3$:	$\%MgO$:
2,125	2,280	2,055	2,260	10,73	16,28
3,460	4,690	3,380	4,650	10,84	16,29
			Theory	10,77	16,36

D. Separation and Determination of Aluminium, Beryllium and Magnesium.

Alum and magnesium sulfate heptahydrate were weighed out in a microbeaker of Fiolax glass, which had been previously weighed with its filterstick. The salts were dissolved in 0,5 cc. of distilled water and then 0,5 cc. of the standard beryllium sulfate solution and 1 drop of concentrated hydrochloric acid were added.

The aluminium was first precipitated with 8-oxyquinoline as before. The filtrate and washings were collected in a microbeaker of Pyrex glass and evaporated to dryness. The excess oxyquinoline in the residue was destroyed according to Ac. The white residue finally obtained was dissolved in 1,5 cc. of hot water. To this solution 3 drops of concentrated hydrochloric acid and 1 drop of alcoholic methyl red solution were added. Then the separation and determination of beryllium and magnesium were carried out as described under B.

Results:

Taken:	mg. $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	2,455	2,540	3,430	
	mg. $BeSO_4 \cdot 4H_2O$	2,608	2,608	2,608	
	mg. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,530	2,480	5,340	
Obtained:	mg. $Al(C_9H_6NO)_3$	2,370	2,480	3,312	
	mg. $BeSO_4$	1,542	1,554	1,557	
	mg. $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	2,535	2,463	5,330	Theory:
% Al_2O_3 in alum		10,80	10,83	10,72	10,77
% BeO in $BeSO_4 \cdot 4H_2O$		14,08	14,19	14,22	14,12
% MgO in $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		16,42	16,31	16,39	16,36

E. Separation and Determination of Phosphoric Acid, Aluminium, Beryllium and Magnesium.

Primary potassium phosphate, alum and magnesium sulfate heptahydrate were weighed out in a microbeaker of Pyrex glass. Then standard beryllium sulfate solution was added and evaporated to dryness on the water bath. The residue was dissolved in 0,3 cc. 1 % nitric acid (1 cc. of concentrated nitric acid, d = 1,2, in 100 cc. of distilled water). After having adjusted the acidity as well as the volume of the solution in this way, the precipitation with molybdate reagent and the determination of the phosphoric acid were carried out according to THURNWALD and BENEDETTI-PICHLER[11].

The filtrate and washings were collected in a Fiolax test tube (quartz is preferable). Then the nitric acid was displaced by hydrochloric acid and the molybdenum precipitated with hydrogen sulfide as described in a previous paper[12]. The filtrate from the molybdenum sulfide precipitate was collected in a microbeaker of Fiolax glass and evaporated immediately to dryness on the water bath. The residue was dissolved in 1 cc. of distilled water and 1 drop of concentrated hydrochloric acid. Then the separation and determination of aluminium, beryllium and magnesium were carried out as described under D.

---

[11] H. THURNWALD and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Mikrochemie, **IX**, p. 329 (1931); Ztschr. analyt. Chem., **86**, p. 41 (1931).

Results:

Taken:					
mg. KH_2PO_4	1,990	2,345	2,535	2,930	
mg. $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	2,245	2,550	2,753	2,844	
mg. $BeSO_4 \cdot 4H_2O$	2,608	2,608	5,215	5,215	
mg. $MgSO_4 . 7H_2O$	2,400	2,737	3,932	4,735	
Obtained:					
mg. $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	3,565	4,230	4,575	5,285	
mg. $Al(C_9H_6NO)_3$	2,190	2,490	2,715	2,790	
mg. $BeSO_4$	1,552	1,557	3,082	3,075	
mg. $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	2,405	2,730	3,935	4,714	
Calculated:					Theory:
% P_2O_5 in KH_2PO_4	51,84	52,20	52,22	52,19	52,17
% Al_2O_3 in alum	10,82	10,84	10,94	10,88	10,77
% BeO in $BeSO_4 \cdot 4H_2O$	14,17	14,22	14,08	14,04	14,12
% MgO in $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	16,46	16,38	16,44	16,35	16,36

High values for aluminium are due to presence of unavoidable traces of iron as shown by discolored aluminium oxyquinoline precipitates.

F. Separation and Determination of Silicic Acid, Phosphoric Acid, Aluminium, Beryllium and Magnesium.

In a previously weighed platinum crucible of 1 cc. capacity the following substances were placed one after the other and the weight was determined after each addition: $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 and precipitated SiO_2 (c. p. from EIMER & AMEND, N. Y. C.), which had been previously strongly ignited. Finally 0,5 cc. standard beryllium sulfate solution was added. The crucible was then placed on a water bath and the solution evaporated to dryness.

---

[12] H. THURNWALD and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Mikrochemie, **IX**, p. 330. — See also A. BENEDETTI-PICHLER and F. SCHNEIDER, Mikrochemie, EMICH-Festschrift (1930), p. 14.

The residue in the crucible was covered with four times its weight of sodium carbonate. The latter was prepared by heating pure bicarbonate. Finally the crucible was covered, placed on a quartz triangle and heated with a Bunsen flame. The intensity of the flame was cautiously brought to its full strength. By inclining the crucible and rotating it, the melt was spread over the walls and undecomposed material brought to the bottom. From time to time the cover was lifted in order to observe whether the melt was still in motion (evolution of carbon dioxide). The melt became clear after about 30 minutes. The crucible was then permitted to cool to room temperature.

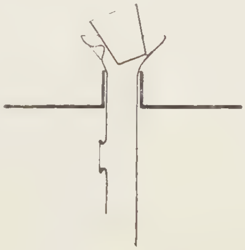


Figure 2.

Material adhering to the cover was now washed into the crucible with hot water. Not more than about 0,5 cc. should be used for this purpose. The crucible was then placed on a glass plate beside a dish of concentrated nitric acid under a glass bell jar and allowed to stand over night. In this way the silicic acid is precipitated slowly and obtained in a form insuring complete decomposition of the melt and permitting easy purification by washing. Then 30% nitric acid was added dropwise until no further effervescence after an addition of acid indicated complete decomposition.

The crucible was now placed on the water bath (Fig. 2) and with the cautious application of a stream of air, the contents were evaporated to dryness. Then the crucible was transfered into an electric drying oven and heated at 110° C. for 30 minutes. The perfectly dry residue in the crucible was treated with 0,25 cc. 30% nitric acid (1 : 1) and permitted to stand for 5 minutes after which 1 cc. hot water was added. Evaporation to dryness and drying at 110° C. were repeated as before, the dry residue was again treated with 0,25 cc. of 30% nitric acid and 1 cc. of hot water was added again after 5 minutes. The crucible was now placed on the water bath and the contents heated for 3 minutes. The crucible remained on the water bath also during the filtration and washing of the silicic acid. The filtration as well as the determination of the silicic acid were carried out with slight variations according to SCHWARZ v. BERGKAMPF[13]. Quantitative filter paper of SCHLEICHER & SCHUELL (white ribbon) was used for the preparation of the filter layer. The silicic acid was washed by the dropwise addition of 1 to 2 cc. of hot water. The filtrate and washings were collected in a microbeaker of Pyrex glass: F 1.

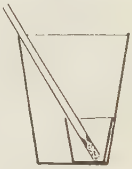


Figure 3.

Finally the platinum crucible and the filterstick were placed in a larger porcelain crucible as shown in figure 3 and heated in a drying oven at 120° C. for half an hour. After this treatment it was easy to remove the roll of filter paper from the wide opening of the filterstick and to place it into the crucible by means of a platinum-tipped forceps. A small piece of moist filter paper held by the same forceps served to wipe off the mouth of the filterstick in order to collect the last traces of silicic acid and to combine them with the main part in the crucible.

The contents of the crucible were first dried, then cautiously ashed and finally ignited for 10 minutes (MEKER burner). Weighing after cooling 5 minutes on the copper block, gave the weight of the impure silicic acid. In order to determine the weight of the impurities the silicic acid was now fumed off by adding 1 drop of water, 1 drop of concentrated nitric acid, 4 to 6 drops of hydrofluoric acid and evaporating to dryness on the water bath.

---

[13] E. SCHWARZ v. BERGKAMPF, Mikrochemie, EMICH-Festschrift (Wien 1930), p. 268.

The residue was twice evaporated with a mixture of 1 drop of water and 1 drop of nitric acid[14]. It was then finally ignited for 5 minutes and weighed again. The difference between the two last weighings gives the weight of the silicic acid.

The filtrate and washings from the silicic acid (F 1) were evaporated to dryness on the water bath (air stream). The residue was dissolved in 0,3 cc. 1% nitric acid and the determination of the phosphoric acid etc. carried out as described under E.

Results:

Taken:	mg. SiO_2	2,005	1,910	
	mg. KH_2PO_4	2,735	2,930	
	mg. $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	1,576	3,295	
	mg. $BeSO_4 \cdot 4H_2O$	2,608	2,608	
	mg. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,275	3,412	
Obtained:	mg. SiO_2	1,986	1,895	
	mg. $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	4,936	5,295	
	mg. $Al(C_9H_6NO)_3$	1,552	3,221	
	mg. $BeSO_4$	1,537	1,555	
	mg. $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	2,260	3,405	Theory.
Calculated:	% SiO_2 in SiO_2	99,1	99,2	100,00
	% P_2O_5 in KH_2PO_4	52,20	52,29	52,17
	% Al_2O_3 in alum	10,93	10,85	10,77
	% BeO in $BeSO_4 \cdot 4H_2O$	14,04	14,20	14,12
	% MgO in $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	16,32	16,39	16,36

G. Analysis of a Micro Sample of the Mineral Kolbeckit.

The material under investigation was part of a specimen kept in the Mineralniederlage in Freiberg (Saxony). A transparent crystal of bright blue color and about 27 mg. weight was at our disposal. The larger part of it was finely powdered in a small agate mortar.

a) Qualitative Analysis.

In order to obtain information as to the behavior of the mineral toward solvents it was first tested for a water content. About 2 mg. of the powder were heated in a capillary tube. A distillate of water droplets proved that water must be a constituent of the mineral. From this fact it was concluded that the mineral would be at least partially soluble in acids.

---

[14] E. g. W. F. HILLEBRAND, The Analysis of Silicate and Carbonate Rocks. U. S. Geological Survey, Bulletin 700.

About 1 to 2 mg. of the mineral powder were now placed into a platinum crucible about of 1 cc. capacity and about 8 drops of concentrated nitric acid were added. After standing over night under a glass bell jar the crucible was placed on a water bath and the acid evaporated. Then 5 more drops of concentrated nitric acid were added and again evaporated on the water bath. The crucible with the residue was now placed into a drying oven and heated at 110° C. for half an hour. Four drops of concentrated nitric acid were then added and after standing for 10 minutes the acid was diluted with 1 cc. of hot water. The contents of the crucible were heated for 3 minutes on the boiling water bath. Then using a filterstick prepared according to SCHWARZ v. BERGKAMPF (l. c.) the insoluble matter was separated from the solution. The crucible remained on the water bath during the filtration and washing with hot water. The filtrate and washings were collected in a micro beaker of Pyrex glass: F 1.

The insoluble residue was collected in the platinum crucible using the technic already described, the filter paper was ashed and the residue treated with hydrofluoric acid and nitric acid in order to remove the silicic acid. — Part of the silicon fluoride was caught in a drop of water and the silicic acid identified as sodium silicofluoride. — The residue in the crucible was covered with a little sodium carbonate and fused. The melt was treated with water and then nitric acid was cautiously added. A clear solution was obtained: S 1.

The filtrate F 1 was first concentrated on the water bath. Then a small part of it was taken and used for the identification of phosphoric acid (ammonium phosphomolybdate), iron (prussian blue) and sodium (sodium-uranyl acetate) in separate tests. The remaining larger part of the concentrated filtrate F 1 was combined with the solution of the melt S 1 and first treated with hydrogen sulfide: no precipitate. After boiling off the hydrogen sulfide, the phosphoric acid was eliminated as ferric phosphate according to BOETTGER[15]. The precipitate was separated by centrifuging and the clear solution transferred into another micro cone by means of a syphon. The third group was precipitated with ammonia and ammonium sulfide: Precipitate P 2 and Filtrate F 2.

---

[15] W. BOETTGER, Qualitative Analyse, Tabellen, p. 18 (Leipzig 1925).

Precipitate P 2 was dissolved in dilute hydrochloric acid and the aluminium was precipitated as 8-oxyquinoline compound. In the filtrate from the aluminium precipitate the excess oxyquinoline was destroyed after evaporating to dryness by heating and evaporating with sulfuric acid and nitric acid. The residue was dissolved in dilute hydrochloric acid and the beryllium precipitated with ammonia. The beryllium hydroxide was dissolved in little dilute hydrochloric acid. After addition of some sulfuric acid star shaped tetragonal crystals of $BeSO_4 . 4H_2O$ separated out and were recognized under the microscope.

Filtrate F 2 was precipitated by addition of ammonium carbonate reagent. Calcium was identified in the precipitate as $CaSO_4 . 2H_2O$. Only traces of magnesium were found in the filtrate and recognized as $MgNH_4PO_4 . 6H_2O$.

In dealing with small amounts of precipitates, the technic developed by EMICH[16] was used throughout the course of investigation.

Result of the qualitative analysis: silicic acid, phosphoric acid, aluminium, iron, beryllium, calcium, traces of magnesium and sodium.

b) Solution of the Mineral and Quantitative Determination of Silicic Acid, Phosphoric Acid, Aluminium and Beryllium.

About 2 to 4 mg. of the powdered mineral were weighed out in the micro platinum crucible. The mineral was treated with nitric acid exactly as described under the heading "Qualitative Analysis". About 1,5 cc. of hot water were used dropwise to wash the insoluble residue. The latter was collected in the platinum crucible, dried, ashed, ignited and weighed as described under F, then treated with hydrofluoric acid and nitric acid as outlined under the same heading, finally ignited and weighed again. The quantity of silicic acid was determined as the difference between the last two weighings.

The residue finally remaining in the platinum crucible was very small. It was covered with a little sodium carbonate and cautiously fused. The melt was treated with a few drops of water. Then 30% nitric acid was added dropwise until a clear solution was obtained, which was quantitatively transferred by capillary syphon and suction into the microbeaker already containing the filtrate and washings from the insoluble residue. The combined solutions were evaporated to dryness on the water bath. The residue was dissolved in 0,3 cc. 1% nitric acid and phosphoric acid, aluminium and beryllium were determined in this solution as described under F.

---

[16] F. EMICH, Mikrochemisches Praktikum (München 1931); F. EMICH-F. SCHNEIDER, Microchemical Laboratory Manual (Wiley, N. Y. C., 1932).

As this time traces of iron were present, it was, of course, necessary to reoxidize the filtrate from the molybdenum sulfide precipitate after removal of the hydrogen sulfide (evaporating to dryness after addition of 0,5 cc. of a solution of 1 cc. nitric acid and 5 cc. hydrochloric acid in 100 cc. of water). The ferric ion was precipitated together with the aluminium as 8-oxyquinoline compound, and gave the precipitate a greenish or greyish color[17]. The weight of the dried oxyquinoline precipitate, of course, must be decreased by the weight of the ferric oxyquinolinate in order to permit the calculation of the weight of aluminium oxide.

c) The Volumetric Determination of the Iron.

After weighing, the oxyquinoline precipitate was dissolved in the microbeaker by addition of 3 drops of concentrated hydrochloric acid and 1 cc. of hot water. The filterstick always remained in the beaker. The solution was sucked through the filterstick into a short testtube of Pyrex glass and then evaporated to dryness on the water bath (stream of air). The residue was treated with sulfuric acid and nitric acid in order to destroy the excess oxyquinoline as outlined under Ab. The white residue finally obtained was dissolved in one drop of concentrated hydrochloric acid and 0,5 cc. of water and the iron content determined according to Benedetti-Pichler[18] using diphenylamine as indicator. It was found convenient to express the titer of the about 0,004-N dichromate solution in milligrams ferric oxyquinolate per cc. as well as in milligrams ferric oxide per cc.

---

[17] A. Benedetti-Pichler and F. Schneider, Mikrochemie, Emich-Festschrift (Wien 1930), p. 4.

[18] A. Benedetti-Pichler, Ztschr. analyt. Chem., **73**, p. 200 (1928).

d) Determination of Calcium.

Filtrate and washings from the beryllium hydroxide precipitate were collected in a microbeaker of Fiolax glass previously weighed with its filterstick. The solution was evaporated down to about 1 cc. volume (water bath and air stream). Then 1 drop of concentrated hydrochloric acid and 0,5 cc. of 3% oxalic acid solution were added and the calcium precipitated by slowly neutralizing with ammonia according to BENEDETTI-PICHLER[19].

The precipitation of magnesium ammonium phosphate in the filtrate from the calcium oxalate was attempted but was — as was expected from the result of the qualitative analysis — without success.

e) Determination of the Water of Hydration.

The water of hydration was determined once by ignition of the mineral sample in a micro platinum crucible and once by igniting in a platinum boat in the combustion tube.

f) Results of the Quantitative Analysis:

			Average:
Weight of sample	1,045 mg.	0,245 mg.	
Loss of weight on ignition	0,245 mg.	0,060 mg.	
Water of hydration	23,45%	(24,5%)	23,45%
Weight of sample	3,500 mg.	2,985 mg.	
SiO_2	0,325 mg.	0,275 mg.	
	9,29%	9,21%	9,25%
$MgNH_4PO_4 \cdot 6\,H_2O$	4,072 mg.	3,500 mg.	
P_2O_5	33,7%	33,9%	33,8%
$Al(C_9H_6NO)_3+Fe(C_9H_6NO)_3$	6,830 mg.	5,760 mg.	
$Fe(C_9H_6NO)_3$	0,079 mg.	0,039 mg.	
$Al(C_9H_6NO)_3$	6,751 mg.	5,721 mg.	
Al_2O_3	21,4%	21,3%	21,35%
Fe_2O_3	0,37%	0,22%	0,29%
$BeSO_4$	1,276 mg.	1,105 mg.	
BeO	8,67%	8,81%	8,74%
$CaC_2O_4 \cdot H_2O$	0,290 mg.	0,255 mg.	
CaO	3,17%	3,28%	3,22%
		Total	100,10%

---

[19] A. BENEDETTI-PICHLER, Ztschr. analyt. Chem., **64**, p. 421 (1924).

Summary.

A complete procedure for a complicated quantitative micro analysis in which a single sample of a few milligrams weight was used, has been carried out for the first time. With the exception of the iron, all determinations, viz. silicic acid, phosphoric acid, aluminium, beryllium, magnesium and calcium, were gravimetric. The technic employed was that developed by EMICH and his school. The results obtained are well within the standards of precision set for macro determinations by HILLEBRAND. Every determination and separation was tested previously separately and in combination with the preceding steps. It is to be further emphasized that the procedure is described in detail so as to permit reproduction by other workers even though it was necessary at times for the sake of brevity to refer back to previous papers of this series.

MICRO VACUUM DISTILLATION.

By

RICHARD A. SMITH.

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University, New York, N. Y.

(Received January 30, 1932.)

One of the most important operations in organic chemistry is that of fractional vacuum distillation. This operation is of equal importance to the organic chemist who wishes to deal with very small quantities of liquids. However, the micro technician is faced with the difficulty that, to date, no satisfactory description of a micro vacuum fractional distillation with efficient temperature control has been reported. PREGL[1] has reported a simple and entirely satisfactory apparatus for simple vacuum distillation. A disadvantage of the PREGL apparatus is that the temperatures of the gases leaving the boiling liquid cannot be taken accurately; the nearest approach to this is to estimate the boiling point from the temperature of the heating bath employed. Obviously this is not satisfactory. A second objection is that a fractional distillation cannot be carried out with the apparatus. It has been found possible to modify the PREGL apparatus so that all its advantages are retained, and so that the two difficulties referred to are overcome.

The revised apparatus is illustrated in Figure 1. The vertical chamber (A) contains the liquid to be vacuum distilled. A suitable vacuum pump is connected at point (B). The horizontal chambers (C), (C′), etc. serve as receiving chambers; the number of these chambers is governed by the number of fractions which are to be taken. A small thermocouple is placed in the distilling chamber at (a) and serves as a means of recording the temperatures of the distilling gases. A heating bath is placed around (A); suitable heating and cooling baths are placed around the collecting receivers (C), (C′), etc. The use of these heating and cooling baths will be explained in detail later. From the foregoing description of the apparatus, it can be seen how the difficulties of the Pregl apparatus have been overcome. A thermocouple acts as a micro-thermometer for recording the temperatures of the gases given off by the boiling liquids; and suitable collecting receivers are introduced into the apparatus to allow of the collection of different distillation fractions.

---

[1] F. PREGL, Quantit. Org. Mikroanalyse, Julius Springer, 1930.

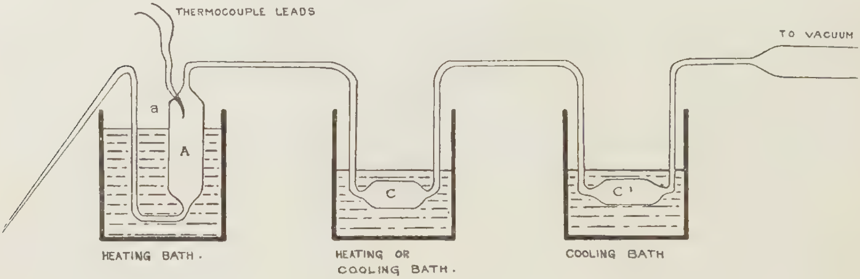


FIGURE 1. APPARATUS FOR FRACTIONAL MICRO-VACUUM. DISTILLATION.

(½ Actual Size)

Preparation of the apparatus.

The apparatus is most conveniently made from an ordinary soft glass test tube. Glass tubing of the proper bore, or Pyrex glass, may be used. If a test tube is used, the sealed end is drawn out to a capillary of from 1 to 2 mm. inner diameter and about 25 to 30 cm. long. Two or more other capillaries are drawn out at points of the remaining part of the test tube. This leaves three or more original sections of the test tube connected by capillary tubing, and with a long capillary at one end. The apparatus is then bent with the aid of a small luminous gas flame to conform to the shape indicated in the diagram. The vertical section near the long capillary is to perform in the capacity of a distilling chamber;

the horizontal section at the other end, originally the mouth of the test tube, is to serve as a means of connecting the apparatus to a vacuum. Each intermediate, horizontal section is to serve as a collecting chamber; as many such sections are formed as there are distillation fractions to be collected. It is possible to draw out as many as four such intermediate sections from an ordinary test tube. If more are necessary, the apparatus can be made from a length of glass tubing. The thermocouple is now introduced into the top of the distilling chamber (at point "a" in the illustration). The thermocouple which was found most satisfactory, was one composed of constantan and nichrome[2]. Wires of a diameter of 0.0125 mm. were used: they were spot welded at their common terminal. The thermocouple is very simply introduced; a small hot flame from a blow-torch is used to soften the glass at the proper point. When the glass is soft, the flame is removed and the thermocouple is pushed into the chamber to a depth of about 0,5 cm. The wires remain covered by a thin layer of glass and in effect, a micro-thermometer is obtained. Due to the protective coating of the glass, there is no possibility of corrosion of the wires of the thermocouple.

The vertical section of the apparatus is placed in a beaker of paraffin oil to serve as a heating bath; the end horizontal section is connected to a vacuum line. If a simple distillation is to be performed, a cooling bath, a beaker of cold water, is placed around the one collecting chamber in the system. Where a fractional distillation is to be carried out, and where such a distillation is to involve the collection of two fractions (there will then be two collecting chambers), the cooling bath is placed around the further collecting chamber, and a heating bath is placed around the collecting chamber nearer the distilling chamber.

Procedure for the Distillation.

A. Simple Vacuum Distillation.

The liquid to be distilled is introduced into the distilling chamber of the apparatus through the long capillary tubing which leads to the atmosphere. The suction pump is used for this operation. The end of the capillary is then drawn out to a very fine capillary to permit the attainment of a very high vacuum and to prevent bumping and superheating. It is possible to work satisfactorily with pressures down to 2 mm. by using a very fine capillary. The inner diameter of the capillary may be made very small where the small glass tubing joins the lower part of the distilling chamber. This may be done by heating the walls of the capillary so that they collapse a bit. If this is done, the air bubbling through the liquid comes through in the form of a continuous stream of very fine bubbles. If it is not done, large air bubbles may come through at irregular time intervals and mechanically carry liquid out of the distilling chamber. This precaution need not be observed with pressures greater than 8 to 10 mm.

---

[2] Nichrome III, Driver-Harris Co., Newark, N. J.

The thermocouple is now connected. The simplest method is to connect the two terminals directly to a sensitive millivoltmeter. A cold junction must be used; a small Dewar flask filled with crushed ice is satisfactory. If this arrangement is used, the temperature can be read directly in terms of millivoltmeter readings. Of course, the thermocouple used must be calibrated[3, 4]. A potentiometer with a cold junction compensator will also be found satisfactory. However, the constantan-nichrome thermocouple recommended produced sufficient current flow to actuate a sensitive millivoltmeter, and a potentiometric method of E. M. F. measurement, requiring only sufficient current to actuate a galvanometer, need not be used.

In a simple distillation, the temperature of the heating bath is gradually raised until a point is reached where the liquid boils. The temperature of the heating bath is then held constant until all the liquid has distilled. The temperature of the gases as indicated by the thermocouple readings will be constant during this distillation. After the distillation, the vacuum pump is disconnected, and the cooling bath removed. The distillate may then be stored in the collecting chamber by sealing off the capillary tubing leading to the chamber.

---

[3] Bureau of Standards, Pyrometric Practice, Bulletin No. 170.

[4] International Critical Tables, Vol. I, p. 58, 1926.

B. Fractional Vacuum Distillation.

In a fractional vacuum distillation, the procedure is a bit more complicated. As an example, a liquid which is to yield two fractions will be discussed. This liquid is introduced into an apparatus with two collecting chambers. The construction of the apparatus has been described. The liquid is introduced in a manner analogous to that described under simple vacuum distillation. The calibrated thermocouple is connected to the millivoltmeter. The vacuum pump is connected. A heating bath is placed around the distilling chamber; a similar heating bath is placed around the collecting chamber nearer the distilling chamber. A cold bath is placed around the further distilling chamber. The two heating baths are now heated until the lower boiling fraction starts to distill. The two heating baths are kept at the same temperature. The gases from the boiling liquid pass through the first collecting chamber without condensing there. The fraction is condensed in the second chamber. When the thermocouple indicates that the first fraction has been distilled, the heating bath around the collecting chamber is removed and replaced by a cooling bath. The remaining heating bath, around the distilling chamber, is then further heated until the second fraction has been distilled. When the distillation is complete, the baths are removed, the suction pump is disconnected, and the fractions are sealed in their respective collecting chambers.

It is obvious that as many fractions as desired may be taken by increasing the number of collecting vessels, and by the proper manipulation of the heating and cooling baths.

Experimental Results:

In order to test the accuracy of the thermocouple readings, parallel vacuum distillations on the micro scale, as described, and on the conventional macro scale were conducted. Pressures in both systems were identical. Readings of the boiling points in the macro system were made on standard Anschütz thermometers. Pressures used varied from 4 to 115 mm. The temperatures varied from 42° to 185°. The agreement in all cases was satisfactory. Octylene, guaiacol, and oleic acid were distilled. It is worthy of note that the distillation of oleic acid proceeded more satisfactorily in the micro system.

The following table serves to indicate characteristic results:

Pressure	B. P. Micro	B. P. Macro	Sample
39 mm.	43°	43°	Octylene
89	61°	62°	Octylene
99	73°	73°	Octylene
5	69,5°	70°	Guaiacol
14	93°	93°	Guaiacol
27	105°	104,5°	Guaiacol
60	120°	120,5°	Guaiacol
115	139°	138,5°	Guaiacol
4	185°	185,7°	Oleic Acid

As an example of micro fractionation, a volume of liquid as small as 0,15 cc. of a solution of equal parts of octylene, guaiacol, and diphenyl ether was quantitatively separated with one distillation. The fractions were collected as has been described. The boilings points of the fractions were then taken by the Emich[5] method and the boiling points were found to be in agreement with those of the pure liquids started with. It was therefore assumed that a quantitative separation of the liquids had been accomplished

Remarks:

The construction of the apparatus may appear to be complicated; actually, such is not the case. With a little practice, the time of construction may be measured in minutes. The material required is simple.

The author wishes to acknowlege the assistance of Dr. Edgar Wagner for the testing and calibration of thermocouples.

Summary:

1. A method has been described for the measurement of the distilling gases in a micro vacuum distillation.

2. A method of fractional vacuum distillation on a micro scale has been described.

---

[5] F. Emich, Monatsh. Chem., **38**, 219.

THE MICRO-DETERMINATION OF TWO LIQUID SOLUBILITIES. THE SYSTEM PHENOL-WATER.

By

RICHARD A. SMITH.

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College of New York University, New York, N. Y.

(Received December 30, 1931.)

In the macro determination of the solubilities of two liquids, where there is a limited mutual solubility, different experimental procedures are resorted to. In the attempt to devise a micro method of analysis it is logical that we first examine the methods successfully used for the larger scale determinations with the idea in mind of ascertaining their adaptability to a micro scale of procedure. Thermostatic methods where the temperature of the system is fixed and where the two liquid phases have arrived at equilibrium by mechanical agitation or the mere expiration of time, are of three types. The first is where the composition of the phases is determined by direct analysis: this can occasionally be done with convenience, but usually liquids do not lend themselves readily to such analysis. This method is adaptable to micro-manipulation in special cases, but as it is not of a general nature it will not be the subject of further discussion here. The second thermostatic method, an ingenious one devised by HILL[1]), is of an indirect type and depends upon measurements of volumes. The solubilities are calculated by simultaneously solving two linear equations, each representing the quantities of the two components in different measuring flasks; there are different quantities of the components in each flask with a corresponding difference in the subsequent volumes of the solutions when at equilibrium. It is believed that this method is not applicable to micro manipulation; exceedingly small quantities of liquids would necessitate very small containers, perhaps necessitating difficulty in attaining equilibrium and making extremely difficult an accurate reading of the two volumes when at equilibrium due to the large surface effect of the container relative to the quantities of liquids, and other factors. The method is applicable to approximate determinations on a micro scale; on a so-called "micro-macro" scale (involving samples of 30 to 50 mg.) the method should be satisfactory and researches are being conducted in this field. This is the only method yielding truly satisfactory results where the change in solubility with a change in temperature is small, or where the solubility curve is parallel, or nearly so, to the temperature axis as in the conventional diagrams of such systems. The third method of this type is a direct volumetric method, the second component is added drop by drop until a second phase forms. Results are often poor, and the method does not appear to be worthy of adaption to a micro scale at this time.

---

[1]) A. E. HILL, Treatise of Phys. Chem, D. VanNostrand Co, N. Y., Page 406 (1925).

It is conceivable that barostatic methods of solubility determination are possible; however, none has as yet been described. The third general method of approach lies in plethostatic methods; i. e. methods involving fixed compositions. The method of ALEXEJEW²) falls in this class; it is the most widely used method for determining the mutual solubilities of two liquids. In this method known weights of the two components are introduced into a glass tube, which is then sealed or stoppered; it is then agitated in a bath of slowly rising temperature and the temperature of the point of homogeneity yields a point on the solubility curve. Different concentrations of components are used to obtain different points, and so a continuous solubility curve can be obtained. As a check on the points so obtained, the samples, which are now homogeneous, can be cooled slowly in a bath and the temperature at which turbidity occurs should be practically identical with the temperature recorded for the point at which the two phase emulsion turned clear.

---

²) ALEXEJEW, Wied. Ann., 28, 305 (1886).

This last described method was successfully adapted to a micro scale and serves as the subject of this report. EMICH[3]) in a report on critical solution temperatures indicates a micro method of technique applicable to such a two liquid solubility study.

The classic example of liquid-liquid systems in heterogeneous equilibrium is the phenol-water system. It is also one of the systems which has received the most study. The pioneer work was done by ALEXEJEW[4]); many others have since contributed reports on the same system[5]).

The system is very well-known; there is an increase in mutual solubility with temperature until an upper consolute point is reached at which point the two phases are identical and at temperatures above which the two liquids are soluble in all proportions.

In the method which will shortly be described 3 to 5 mg. samples were found to be sufficient and the solubility points were determined by the fall in temperature method — the transition from one homogeneous phase to turbidity being noted. The samples were contained in small, sealed capillary tubes.

Chemicals Used: Distilled water was used for the water component. The phenol was specially purified. The best phenol obtainable commercially was thrice distilled in an all glass system — a distilling column was used and sharply cut fractions were taken. All phenol used melted within ± 0,06° of 40,92°. It has been found by other workers that phenol of such purity is essential.

---

3) F. EMICH, Ztschr. analyt. Chem., **54**, 495 (1915).

4) ALEXEJEW, loc. cit.

5) E. PATERNO and G. AMPOLA, Gazz. chim. Ital., **27**, I, 481 (1897).
V. ROTHMUND, Ztschr. physikal. Chem., **26**, 433 (1898).
F. A. H. SCHREINEMAKERS, ibid., **29**, 577 (1898).
J. FRIEDLAENDER, ibid., **38**, 385 (1901).
O. SCARPA, Journ. Chim. Phys., **2**, 447 (1904).
J. TIMMERMANS, Ztschr. physikal. Chem., **58**, 129 (1907).
M. RÓZSA, Ztschr. Elektrochem., **17**, 934 (1911).
A. SMITS and MAARSE, Proc. Acad. Sci. Amsterdam, **14**, 192 (1913).
R. DUBRISAY and TOQUET, Bull. Soc. chim. France, **25**, 354 (1919).
S. H. RHODES and A. L. MARKLEY, Journ. physic. Chem., **25**, 527 (1921).
P. LEONE and E. ANGELESCU, Gazz. chim. Ital., **52**, II, 61 (1922).
A. E. HILL and W. M. MALLISOFF, Journ. Amer. Chem. Soc., **48**, 918 (1926).

Procedure:

I. Introduction of the Sample Into a Capillary Tube.

It is first necessary to introduce the two liquids in known quantities into a capillary tube. There are different methods by which this can be accomplished; the first method tried was to use a capillary tube with both ends open and with one end drawn out to a hair fine capillary as in (A) of Figure 1. This is the type of capillary as used by EMICH[6]) for the determination of micro boiling points. The capillary tube was weighed empty to 0,001 mg., the fine end of the capillary tube was then introduced into one of the two liquids (in this case pure water) and the desired amount of liquid was allowed to enter the capillary by means of capillary rise, see (B) of Figure 1. The capillary was then wiped free of adhering liquid and weighed again, after which the fine end was introduced into the second liquid (molten phenol) and the second component introduced into the capillary in a manner analogous to the first. One end of the capillary was then sealed, the liquid was centrifuged to that end, and the other end then sealed. It is very important at this point to insure caution that none of the contents of the capillary tube is lost and that

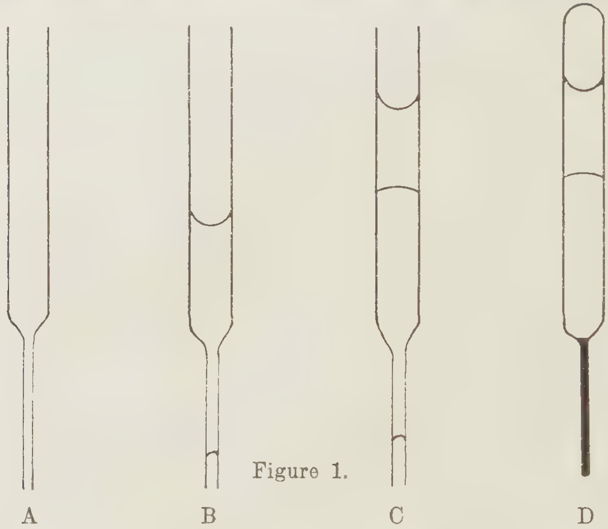


Figure 1.

---

[6]) F. EMICH, Monatsh. Chem., 38, 219 (1917).

too large an air space is not allowed to remain in the capillary. On sealing one end of the capillary, it is desirable to form a glass-rod handle to enable the tube to be more easily affixed to a thermometer in the determination to follow. This is accomplished in the same manner as in a micro Rast determination of a molecular weight⁷).

From the three weighings it is obviously easily possible to calculate the concentrations of the components in the capillary tube. The two components are thus introduced in known concentrations into a capillary tube and sealed there, as in (D) of Figure 1, ready for the solubility determination.

A great disadvantage of the method just described lies in the fact that it is difficult to introduce samples of the exact concentration desired. This is a particularly important factor in the vicinity of a consolute point where the change in solubility with a change in temperature is great; and it is in this range that the ALEXEJEW method lends itself to fine measurement. There are also certain experimental manipulative points which it would be desirable to eliminate. Fundamentally the second modification consists in introducing one homogeneous liquid phase into a capillary tube, instead of two distinct phases. If the concentration of the components in this liquid phase is known, it is obvious that it makes no difference if there is some mechanical loss of solution in filling and sealing the capillaries. This is a point of importance as in the first method such a loss entailed a change in composition. The homogeneous solution was prepared by weighing out the desired quantities of components in a micro weighing bottle fitted with a tight ground-glass stopper; this is a small sized adaptation of the conventional macro weighing bottle. By this method any desired quantity of either component can be weighed out, and very small quantities can be used (it was found desirable to use from 1 to 8 mgs. of a component). After weighing both components in the weighing bottle, it was stoppered and heated so that the two phases became mutually soluble. The bottle was then shaken to insure homogeneity of the contents, and one or more samples were drawn out into capillary

---

⁷) F. PREGL, Die Quantit. Org. Mikroanalyse, p. 237, Julius Springer, **1930**.

tubes. The method which has been described for the introduction of a liquid into a capillary tube may be used here; it is entirely successful. Another method which may be used with success is that used by Pregl in the combustion of liquids[8]); it consists of a capillary tube sealed at one end and drawn out to a micro capillary at the other, air is expelled from the tube by the application of heat, the open end is then dipped in the liquid and the contraction of the remaining gas in the capillary tube causes the liquid to enter the tube. The disadvantage of the first method described is primarily a function of the time factor; it is undesirable that the entering liquid be cooled sufficiently so that there is a separation into two components. In the second method described there is often too large an air space present in the filled capillary; this air space cannot be conveniently controlled. A third method, which has proven the most satisfactory is the method used by Mr. Franz Silbert[9]) in this laboratory. In this method a capillary pipette, as in (A) of Figure 2, is used; this

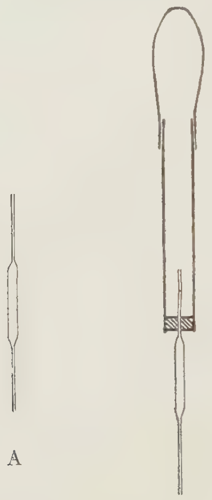


Figure 2.

---

[8]) F. Pregl, loc. cit., page 78.

[9]) The author also acknowleges his indebtedness to Mr. Silbert for many micro weighings which he performed in connection with the experiments herein described.

consists of a capillary tube of about 1—2 mm. largest internal diameter, drawn out on each end to a fine micro capillary. The overall length being about 5 cm.; the capacity of the enlarged section being about 3 to 5 mgs. of water. The liquid was drawn into the capillary pipette by means of a suction micro syringe (B) in which the capillary tube is placed. This syringe is most conveniently made from an eye-dropper and a small cork. After filling, the ends of the capillary pipette were sealed (a micro-handle being formed on one end) and the capillary tube placed in an electric oven until it was desired to make the actual determination. The rapidity with which this tube can be filled and sealed eliminated the most important disadvantage of the first method described. The fact that the quantity of residual air space in the completed, filled capillary can be accurately and easily controlled eliminates the difficulty of the second method

II. The Determination of the Solubility Point.

It is desirable to make this determination while the liquid in the capillary is homogeneous; where there is unavoidable separation due to transfer of the capillary from an oven to a water bath, the interval of transfer can be made sufficiently short so that no error is introduced. The greatest difficulty of the method lies in the separation of the two liquids, as it is then somewhat difficult and tedious to again attain homogeneity. The filled capillary tube was transferred to a water bath which was at a temperature high enough to prevent separation into two phases. While in the bath, the capillary was fastened to the bulb of a thermometer by means of a small rubber band; the glass handle which was formed on the capillary in sealing facilitated this. The thermometer used read to tenths of a degree; in the vicinity of the consolute temperature one reading in hundreths can be used with accuracy. The capillary tube must at all times be completely immersed in the water bath. The water bath was equipped with an efficient stirrer so that a uniform temperature prevailed in all parts. The bath was then allowed to cool slowly; the rate of cooling was 1° in three minutes in the vicinity of a solubility point. When the solubility point was reached, the contents of the tube instantly became uniformly cloudy. The temperature was then read. The transition is startling in its suddenness and the determination is extremely simple. In the macro determination the solubility point is often determined on the rise in temperature, and the point where the two liquids become one is determined. Mechanical agitation is essential. This method is not as easily adapted to micro methods as the method just described as the small internal diameter of the capillary tubes does not admit of uniform distribution of the contents by corresponding mechanical agitation. The fall in temperature method is so satisfactory that the rise in temperature type is non-essential; if such a method is desired there is no doubt that a device which continuously centrifuged the contents of the tube from end to end could be devised, and this would lead to satisfactory determinations. Such a mechanical device would, however, be rather complicated, and one of the chief claims of the method being described herein is simplicity. However, determinations on the rise in temperature method can be made if the two liquid phases are not allowed to separate to an appreciable extent. After a determination by the fall in temperature method has been made and the contents of the capillary are still uniformly clouded, the water bath can be heated and the point at which homogeneity occurs noted. Sometimes satisfactory determinations can be made by this method; after the clouding of the two liquids at the transition point, the bath should not be allowed to cool more than 0,5° and the time interval between the determinations of the solubility by two methods should never be over ten minutes. In satisfactory determinations the cloudy contents must clear up uniformly and instantly; where such is the case the solubility point checks with that obtained by the fall in temperature method, being slightly higher in all cases. It is recommended that only the fall in temperature method be used.

In cases where the two components form two distinct phases in the capillary tube, due to the method of filling the capillary or due to the fact the contents of a capillary tube have been allowed to cool, additional experimental procedure is necessary. It is absolutely essential that the contents of the capillary tube be entirely homogeneous if correct results are to be obtained.

When using a capillary tube as a container, it is with some difficulty that a heterogeneous system is converted to a homogeneous one. The method of bringing this about is to centrifuge the capillary tube from end to end in a bath of hot water as in the extraction method described by NIEDERL[10]).

The tube is turned end to end after each centrifuging; it being completely immersed in hot water all the time. Ten to fifteen such centrifugings are generally necessary. A fine glass thread or platinum wire one mm. in length when introduced into such a capillary tube reduces the number of centrifugings necessary. Capillary tubes containing homogeneous contents were stored in an electric oven at 75° to avoid the contents seperating into two layers. Such tubes could be stored indefinitely and solubility determinations made or repeated at any time.

III. Discussion of Results.

In the following table the results of solubility determinations made by the micro method described are indicated. They are in agreement with those reported by other workers using macro types of procedure. The total quantity of liquid in a sample never exceeded 10 mg.

Table I.

Sample No.	Total Percent Phenol.	Solubility Point.
1	60,02	53,5°
2	55,98	60,4°
3	50,21	62,5°
4	36,29	65,5°
5	34,39	65,4°
6	33,88	65,4°
7	31,49	65,3°
8	29,27	65,3°
9	26,80	65,2°
10	21,50	63,1°
11	17,49	55,2°

---

[10]) J. B. NIEDERL, Journ. Amer. Chem. Soc., 56, 474 (1929).

The solubility curve utilizing these results is shown in Figure 3. It has been stated that determinations made with a rise in temperature yield somewhat higher results — these follow:

Sample	Total Percent Phenol	t (fall)	t (rise)
A	66,98	34°	35°
B	64,86	45,4°	46,0°
C	61,78	52,0°	52,2°
D	60,02	53,5°	53,7°
E	50,21	62,5°	62,7°

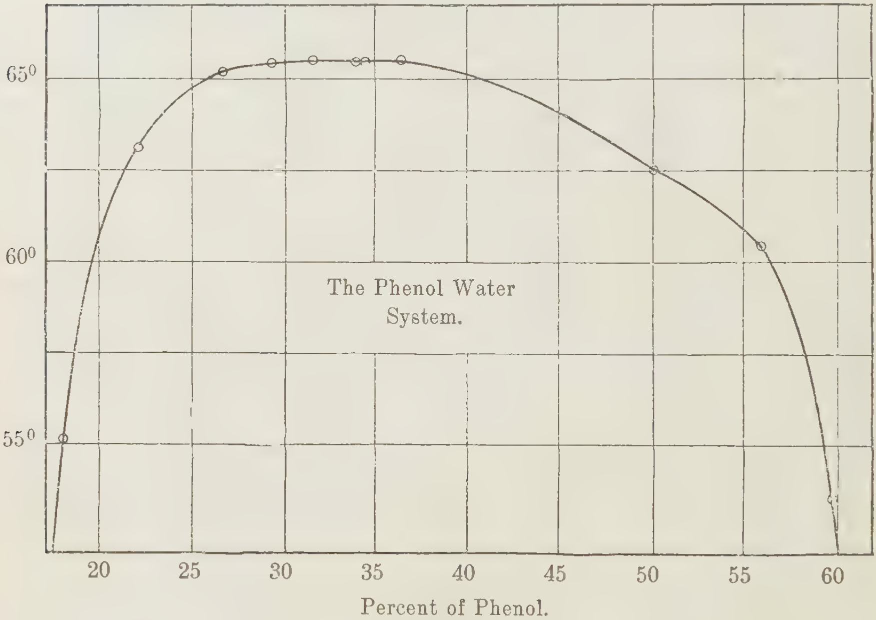


Figure 3.

The difference does not appear to be as marked as in the case of macro determinations of a similar nature. This difference is in the direction expected due to lags in heat transfer caused by the poor conductivity of the glass of the capillary containers.

Summary.

A satisfactory micro method of two liquid solubility determinations by the method of ALEXEJEW has been described.

MICRO VAPOR DENSITY DETERMINATION METHOD.

PART. I. ON THE DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT.

By

JOSEPH B. NIEDERL and **WM. J. SASCHEK.**

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University New York, N. Y.

(Received April 1, 1932.)

For solid organic substances not only the classical molecular weight determination methods[1-4]), but, in addition, a number of special methods have been made use of in organic micro chemistry[5-13]). The situation in regard to micro analytical molecular weight determination methods for liquids is, however, not such a fortunate one[14-19]). The purpose of this communication is to comply with requests made to the authors to give an account at this time of the developments and improvements of the micro vapor density method described by NIEDERL in 1929[20]). The amounts of material required are within the limits set by PREGL[1]) and EMICH[2]) for the so-called "milligram" processes.

A weighed sample is vaporized in a flask in such a manner, that its vapors displace an equal volume of mercury under controlled conditions. The quantity of the displaced mercury is determined either gravimetrically, or with lesser accuracy, volumetrically. Applying the necessary corrections for pressure, temperature, and expansion for both the flask and the mercury, the volume of the vapor under standard conditions is determined. From this volume the vapor density or the molecular weight of the substance is calculated in the usual manner. Mercury is the only sealing liquid which does not dissolve any of the liquids tested and which reacts only with agressive substances. Its high specific gravity makes a calculation of the volume from the weight of the expelled amount very accurate.

Although there are several macro displacement methods known[27—29]), the method described herein is necessarily a micro method and has no forerunner in the macro analytical field because the amount of expelled mercury becomes too large to be weighed on an ordinary analytical balance with a weighing range of 200 g, as the following table illustrates.

micro:

Mol. weight:	weight of sample:	volume of vapor:	weight of displaced mercury:
30	5 mg	5 ccm (approx.)	68 g (approx.)
60	5	2,5	34
120	5	1,25	17
240	5	0,63	8,5

macro:

Mol. weight:	weight of sample:	volume of vapor:	weight of displaced mercury:
30	0,15 g	150 ccm (approx.)	2 kg (approx.)
60	0,15	75	1
120	0,15	38	0,5
240	0,15	19	0,25

Apparatus.

The apparatus used in the determinations is shown in Fig 1. It consists of a flask (A) of from 7—10 ccm capacity, which is large enough for most cases, as the foregoing tabulation indicates. The flask may be spherical (2,5 to 3 cm in diameter) or pear shaped (neck: 0,7 to 1 cm bottom: 2,5 cm height: 3 cm). A tube (B) of about 8 cm in length and 0,5 to 0,7 cm bore is fused in the upper part of the flask. This tube serves the dual purpose of a handle and a receptacle for the thermometer (C) used to ascertain the temperature in the inner bulb (D). Near the bottom of the flask is a ground glass neck (E) (1 cm long, 6 mm bore) into which the hollow stopper (F) (1,5 cm long, 5,2 to 5,4 mm bore) of the capillare outlet tube or capillary delivery tube (F) fits. Just beyond the stopper the outlet tube is bent vertically upward for a length of about 6 cm and then horizontally for 3 cm, so that its orifice extends behond the heating bath (G). The optimal inner diameter of the capillary outlet tube is 2 mm, as a wider bore causes larger drops to fall from the orifice, thus reducing the accuracy of the volume measurement. A capillary outlet tube of a smaller diameter has a higher capillary despression, whose inconstancy gains in influence upon the accuracy of the determination of the pressure under which the vapor is confined.

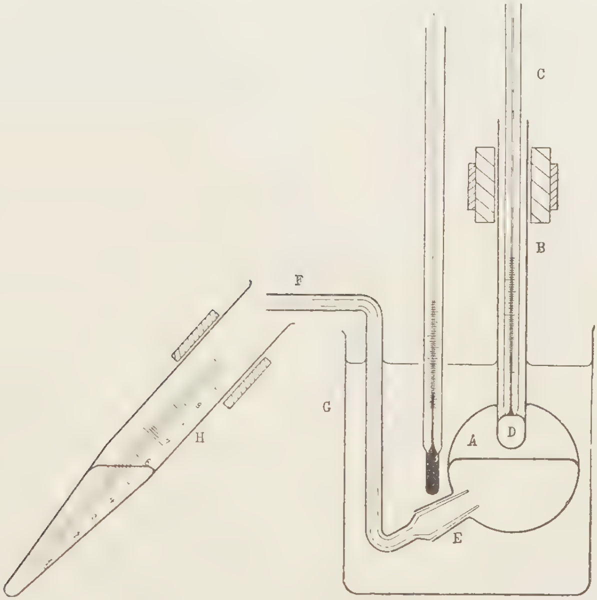


Fig. 1. Vapor density apparatus.

A receiver (H) finally provides for quantitative collection of the displaced mercury. The receiver may be a small graduated test tube (7 to 10 cm capacity) or a graduated conical centrifuge tube of similar dimensions.

Originally a much larger flask was used In the neck of the flask there was inserted a ground glass stopper through which the lower, vertical part of the outlet tube extended to near the bottom. The upper part of the outlet tube was bent at right angle past the stopper and the horizontal portion thus formed extended well beyond the heating bath. The tube was bent once more at a right angle so that it finally had the form of an inverted "U". The next improvement was brought about by having a separate outlet tube. A thermometer which also served as a holder for the capillary pipet containing the sample, extended through the ground glass stopper. Experiments at higher temperatures (100° C and higher), however showed, that the ground glass stopper was no longer gas tight. It was, therefore, again necessary to change the construction of the apparatus. The opening of the flask was placed near the bottom (Fig. 1 a) as there is no difficulty in preventing mercury from leaking through a greased ground glass joint. The flask (A) then has in the upper part a tube (C) fused in to hold the thermometer and to serve as a handle; on one side just above the bottom there was a outle tube (D) opposite which was the ground glass neck (B) for the introduction of the sample and the mercury. Into this neck a solid ground glass stopper fitted snugly. This form was then changed to the still more convenient apparatus as shown in Fig. 1 and described in detail before. Also this apparatus can be still further improved by replacing the tube B by a regular thermometer, enabling the estimation of the temperature inside the flask with a greater accuracy. Furthermore glass hooks may be fused on to the neck E and the outlet tube F near the hollow stopper. An elastic metal spring could then be used to prevent any loosening of the connection. The use of a thermocouple instead the thermometer for the determination of the temperature will be a further improvement. Furthermore the apparatus as discribed in Part II of this communication can be used with advantage for the work set forth herein.

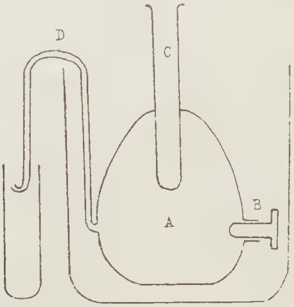


Fig. 1 a. Vapor density apparatus.

Corrections.

For the calculation of the vapor density the heat expansion of the flask and the mercury must not be neglected. This correction is determined empirically. To find the correct pressure of the vapor at which its volume is measured several corrections, as shown later, must be added to the barometric pressure.

Determination of the expansion correction (c_1).

The clean flask is completely filled with pure and dry mercury. To overcome some difficulties in filling the capillary outlet tube the filling device as shown in Fig. 2 (A) is employed. It consists of a glass tube (a) of about 3—4 cm in length and about 5 mm in inner diameter, one end of which is drawn out to a fine capillary (b) of about 2 cm length. This capillary must be fine enough to allow introduction into the capillary outlet tube of the apparatus. To the other end an elastic rubber cap (c) is attached. By means of this simple dropper the delivery tube of the apparatus can be filled completely. Sometimes small bubbles of air may remain in the outlet tube, the removal of which can be accomplished by using a fine, flexible platinum wire. This wire is brought into the outlet tube and pushed down to the air bubbles, these air bubbles are carried out, then, by slowly withdrawing the wire. Finally the apparatus is placed into the heating bath. For temperatures up to 100° C a water bath is most conveniently used.

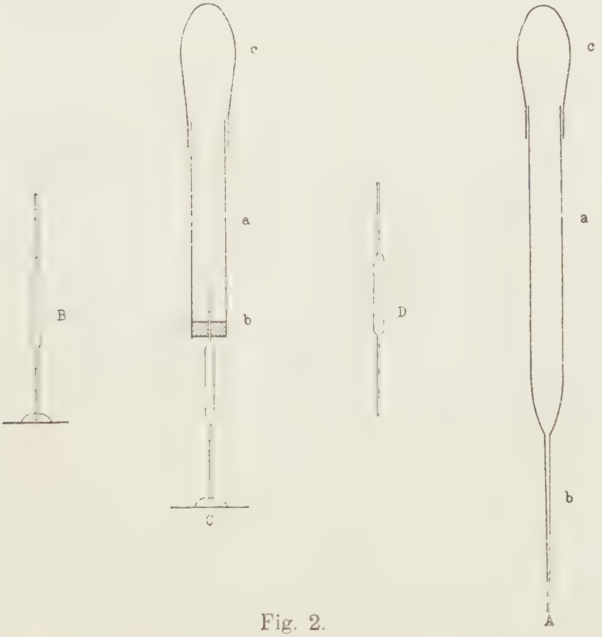


Fig. 2.

A: mercury filler. B: capillary pipet. C: pipet filler. D: capillary pipet (filled).

The receiver (H) is than weighed on an ordinary analytical balance. As soon as an even temperature is attained in the system (the thermometer in the top of the flask of the apparatus as well as the one in the bath liquid should show the same temperature) the receiver is placed beneath the orifice of the capillary outlet tube as shown in Fig. 1. Then the initial temperature (t_1) is determined.

The bath is then heated slowly until the water boils, it is kept boiling for at least 15 minutes to insure an even final temperature (t_2) throughout the entire system. When no more mercury is expelled over a period of about 10 minutes, the receiver, containing the mercury expelled on account of its expansion for a given temperature range ($t_2—t_1$), is removed and weighed. Any water condensate in, or on the outside, of the receiver is carefully removed, using a cotton wad. The weight of the mercury (m) ascertained, divided by the temperature interval ($t_2—t_1$) then gives the expansion correction (c_1) in grams per 1° C for the apparatus in question:

$$c_1 = \frac{m}{t_2 - t_1}$$

It is self-evident that c_1 corrects for the difference in the expansion of the mercury and that of the flask. The values for m at various temperatures may be plotted as shown in Fig. 3 and the amount of expelled mercury for a given temperature interval may then be read easily from the resultant curve.

Determination of the pressure (P):

The pressure of the vapor is composed of the barometric pressure (barometer reading [p_a] to which the temperature correction [p_b] has been applied; p_b being about —2,6 mm) and the pressure of the mercury column in the capillary outlet tube (p_c) of the apparatus. As this mercury column is within the bath at approximately 100° C, its height must be reduced to that at 0° C adding the correction p_d. This correction amounts to about —1 mm for a column 40 mm in height for the temperature interval from 0°—100° C. As the inner diameter of the capillary outlet tube is 2 mm, a further pressure correction becomes necessary, namely the correction for capillary depression (p_e) which in this

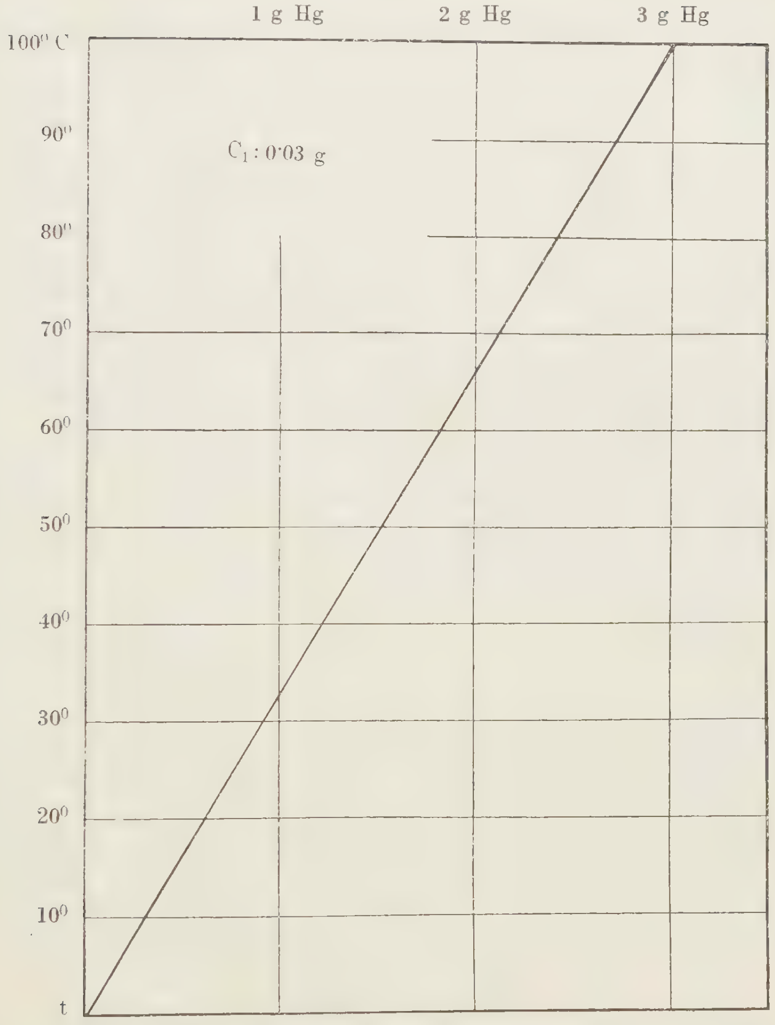


Fig. 3. Calibration graph for apparatus A.

case amounts to 8 mm. Finally the vapor pressure of the mercury (p_f) at the final temperature (T_2) must be taken in account.

$$P = p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f$$

a) Preparation of the sample:

5 to 10 mg of the liquid the molecular weight of which is to be determined, is introduced into the capillary pipet, Fig. 2 (B),

which is 4 cm long and has in the center an expanded section of about 5 mm in length and about 1 mm in internal diameter. The filling of these capillary pipettes may be accomplished in one of the following ways, depending upon the nature of the liquid. It may be drawn into the weighed pipet by means of suction, or simpler by capillary attraction. Or the filling device (C) as shown in Fig. 2, may be made use of with advantage. This device consists simply of a glass tube a of about 5 cm in length and 5 mm in width, to one end of which a flexible rubber cap (c) is attached, while in the other is inserted a solid rubber stopper (b) or cork, with a fine hole to hold the capillary pipet. The liquid is drawn into the pipet by pressing on the rubber cap and allowing it to expand, just as liquids are introduced into an eye dropper. The outside of the pipet is then wiped and sealed by means of a micro burner at its capillary end. The pipet is removed from the rubber stopper and the remaining end sealed. It is then ready to be weighed on a micro chemical belance to ± 0,001 mg.

The capillary pipet can be made very easily from a soft glass test tube or glass tubing by first making capillaries of about 1 mm inner diameter (the same kind of capillary tubing as used in the conventional melting point determination). A piece of such capillary tubing is heated at about its center and drawn out to a hair capillary. At a distance of 4—5 mm another similar capillary is made. The capillary pipet thus formed, whereby a small section of the original melting point tubing forms the bulb, is then cut to such a length that it will conveniently fit into the apparatus.

The directions given by PREGL[1]) for preparing liquid samples for the DUMAS analysis may also be followed with advantage.

b) Procedure:

Before the introduction of the pipet into the apparatus it is centrifuged, so that one of the capillary ends is free from liquid. This portion is then broken off and the pipet and the broken end is quickly introduced into the flask which then is completely filled with mercury. The ground glass stopper of the outlet tube is treated with stopcock grease and then inserted and completely filled with mercury as previously described. It is advisable to fasten the outlet tube to the flask in order to prevent the stopper from loosening. A rubber band or soft wire were found to be satisfactory for this. The filled apparatus is then placed into the cold bath (for substances boiling below 100° C water is used) to attain a constant temperature. In the meantime the receiver is weighed, ready to be placed underneath the orifice of the delivery tube as soon as the apparatus has reached equilibrium in temperature. In case the mercury has receded, the delivery tube must be refilled using the procedure and the filling device described in the determination of the expansion correction.

After the initial temperaure (T_1) has been ascertained the water bath is slowly heated to boiling and kept so for about 15 minutes and the final temperature (T_2) is then noted. Finally the receiver containing the displaced mercury (g) is removed and weighed on an ordinary analytical balance.

At this point the pressure correction p_c is determined by measuring the difference in the levels of the meniscus of the mercury remaining in the flask and the orifice of the capillary outlet tube. To facilitate this the flask may be calibrated in such a way, that from the mercury meniscus in the flask the pressure correction p_c can be read directly.

It is quite evident, that the apparatus upon cooling can easily be refilled by having the delivery tube dip into a mercury reservoir before the apparatus is allowed to cool. Subsequent cooling will cause mercury to be drawn in and check determinations can be performed without the introduction of a fresh sample. In this manner the vapor density of a substance can be determined repeatedly on one single sample.

Determination of the boiling point.

It should be mentioned, that the method just described not only permits the determination of the vapor density (or molecular weight of the sample but in addition the boiling point of the substance can be determined simultaneously in two ways, namely on heating and upon subsequent cooling.

a) on heating:

The apparatus is filled with mercury after the introduction of the sample as described before. If only the boiling point of the substance is to be taken the sample does not have to be weighed. Upon heating a temperature will be reached when the flow of mercury will be very rapid for a short temperature interval (1° C and less[35]). At this temperature the vapor pressure of the substance under investigation, becomes even to the pressure in the apparatus. Vaporization of the substance therefore takes place and the rapid flow of mercury occurs. At the same time formation of a vapor space in the flask can be seen.

b) on cooling:

The taking of the boiling point of the substance upon cooling after vaporization,- of the sample, is still more accurate than the determination of it upon heating, as the danger of super heating is out of question. The actual observations can be done in two ways.

In the first way the receiver is removed. Upon cooling the mercury will recede from the capillary outlet tube into the flask. Further cooling will force air bubbles through the outlet tube into the apparatus. At a certain temperature there will be a rush of air bubbles into the flask. At this point condensation of the vapor takes place an accurate determination of the boiling point is thus possible.

The same determination can also be carried out in the following manner. Before cooling, the delivery tube of the apparatus is attached to a filling device for refilling the flask with mercury. At the condensation point the gas space in the apparatus will disappear causing a rapid influx of the mercury into the flask. This second way permits then the determination of the boiling point (as the condensation point) to be repated on one single sample.

Preliminary results obtained are very encouraging and the method appears to be suited for the attainment of at least as high precision as the conventional macro- or micro[36, 37]) methods so far known.

Experimental Part

Determination of the expansion correction (c_1):

$$c_1 = \frac{m}{t_2 - t_1}$$

m: grams mercury expelled,
t_1: initial temperature,
t_2: final temperature.

	t_2:	t_1:	$t_2 — t_1$:	m:	c_1:
Apparatus A:	99,5°	—21,2°	= 78,3°	2,3452 g	0,02995 g
	99,5°	—15,8°	= 83,7°	2,5205 g	0,03000 g
	99,9°	—16,0°	= 83,0°	2,4756 g	0,02990 g
average:					0,02995 g
Apparatus B:	99,5°	—21,2°	= 78,3°	2,3451 g	0,02995 g
	99,5°	—20,0°	= 79,5°	2,3675 g	0,02979 g
average:					0,02987 g

Results of determinations.

Calculated from the vapor density.

$$M = 62351 \frac{wt\ (273{,}2 + T_2)}{V \cdot P}$$

M = molecular weight
wt = weight of the sample
T_2 = final temperature

$$V = \frac{g - [c_1 (T_2 - T_1)]}{d} - v_s$$

V = volume of vapor
g = weight of displaced mercury
c_1 = correction for expansion per 1° C
T_1 = initial temperature
d = density of the mercury at T_2
v_s = volume of the sample $\left(\frac{wt}{d_s}\right)$
d_s = density of the substance.

$$P = p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f$$

p_a = barometer reading
p_b = temperature correction for the barometer (approx. — 2,6 mm)
p_c = height of the mercury in the outlet tube
p_d = temperature correction for p_c (about — 1 mm when mercury column is 40 mm at 100° C)
p_e = capillary depression (8 mm for a 2 mm bore)
p_f = vapor pressure of mercury at T_2

Table I

	wt:	g:	$c_1(T_2-T_1)$:	V:	T_2:	T_1:	P:	M:	
Apparatus A:									
	mg	g	g	ccm			mm	found	theor.
Ethyl alcohol:	9,944	82,6283	2,2276	6,033	100,5	26,0	811	47,3	46,0
	7,722	65,0018	2,3143	4,704	99,5	22,1	809	47,0	
Ethyl Ether:	7,591	42,0772	2,4697	3,066	100,1	17,5	803	73,9	74,0
(repeated)		42,2489	2,6050	3,069	100,5	10,4	806	73,6	
Acetone:	10,668	69,9700	2,2843	5,082	99,9	23,5	819	59,6	58,0
	7,087	48,5337	2,6671	3,445	99,2	10,0	806	59,2	
(repeated)		48,5970	2,7149	3,446	99,8	9,0	806	59,3	
Chloroform:	16,121	53,0274	2,3059	3,809	99,0	21,8	827	118,7	119,4
	ccm								
Air:	3,270			4,220	100,0	16,5	813	28,92	28,97
	1,909			2,410	99,0	24,5	808	28,64	
	0,613			0,800	99,5	14,0	810	28,82	
Apparatus B:									
	mg								
Methyl alcohol:	7,029	83,6185	2,4195	6,090	99,0	18,0	829	32,3	32,0
Benzene:	6,875	35,0865	2,2096	2,470	100,1	26,2	808	80,6	78,0
	12,994	63,4265	2,3149	4,592	99,0	21,5	814	80,5	

The substances used in the above determinations were purified according to directions available in the literature. From these determinations, as well as from numerous others, not published herein, it was concluded that the temperature existing in the apparatus had to exceed the boiling point of the substance by about 40° C in order to obtain accurate results.

The results nevertheless indicate, that this method is at least as accurate as the conventional macro methods of V. Meyer[21—26]), A. W. Hofmann[27—29]) and A. Dumas[30—34]). Work is now being done along the lines of attaining a still greater accuracy for this method and for adapting it to higher boiling liquids and solids. Some of the preliminary results on the latter are listed below:

Table II

	wt:	g:	c_1:	V:	T_2:	T_1:	P:	M:	
	mg	g	g	ccm			mm	found	theor
Toluene:	7,845	54,4983	0,1375	2,960	130	25	765	87,0	98,0
	5,662	36,0942	0,1375	1,590	131	25	765	88,0	
m-Xylene:	7,625	53,0230	0,1039	2,648	196	20	768	109,0	106,0
	7,814	58,658	0,1180	2,826	207	24	768	107,8	

	mg	g	g	ccm			mm	found	theor.
	wt:	g:	c_1:	V:	T_2:	T_1:	P:	M:	
p-Cymene:	4,020	39,1660	0,1206	1,179	220	22	760	138,0	134,0
	6,540	49,5970	0,1206	1,968	220	22	767	133,0	
	4,795	41,195	0,1039	1,578	219	21	767	122,0	
Phenol:	9,858	82,654	0,1180	4,510	223	22	757	89,3	94,1
	3,822	40,077	0,1039	1,564	210	21	770	95,6	
	5,348	55,8901	0,1375	2,320	203	25	764	90,0	
	5,739	57,1927	0,1375	2,500	202	25	764	89,0	
o-Cresyl methyl-ether:	7,362	56,3200	0,1206	2,446	223	21	757	123,0	122,0
Aniline:	5,562	49,995	0,1039	2,211	210	20	772	94,0	93,1
	6,347	61,6924	0,1375	2,760	202	25	764	89,0	
	6,450	61,8226	0,1375	2,790	200	25	764	89,0	

The above determinations were carried out with an older apparatus (Fig 1 a). For heating Wood's alloy, contained in an iron crucible surrounded by a sand bath, was used. This arrangement however, did not allow to estimate the final temperature (T_2) with any great precision. Since above 200° C the vapor pressure of the mercury becomes appreciable, an error in the final temperature determination seriously affects the results.

The authors are indebted to Dr. OTTO R. TRAUTZ for his valuable advice and constructive criticism of this method. They also desire to express their thanks to Mr. FRANK SILBERT of this laboratory for the many initial determinations carried out in the last few years and the several improvements suggested.

Summary.

NIEDERL's original micro vapor density method was improved in a number of ways. The experimental conditions were further studied and the necessary corrections for temperature, pressure and expansion were determined.

The method in addition to the vapor density determination permits the simultaneous determination of the boiling point of the substance in two ways. All determinations (vapor density and boiling point) can be repeated any number of times with a single sample of a few milligrams in weight.

Bibliography.

¹) PREGL, F., Quantitative organic microanalysis. P. Blakiston's Sons and Co., Philadelphia 1930.

2) Benedetti-Pichler, A., Fortschritte der Mikrochemie, F. Deuticke, Leipzig 1927.

3) Lieb, H., and Benedetti-Pichler, A., Mikrochemische Analyse, Lunge-Berl, Chemische Untersuchungsmethoden, J. Springer, Berlin 1931.

4) Emich, F., Mikrochemisches Praktikum, T. F. Bergmann, Munich 1931.

5) Weygand, C., Quantitative analytische Mikromethoden der org. Chemie, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1931.

6) Barger, G., B., **37**, 1754 (1904).

7) East, K., ibid., **54**, 1979 (1921); **55**, 1051, 3727 (1922); Mikrochemie, **I**, 12 (1923).

8) Rieche, A., B., **59**, 2186 (1926).

9) Berl, E. and Hefter, O., A., **478**, 235 (1930).

10) Signer, R., ibid., **478**, 246 (1930).

11) Schwarz, K., Monatsh. Chem., **53**, 926 (1929).

12) Friedrich, A., Mikrochemie, **VI**, 97 (1928).

13) Smith, J. H. C. and Milner, H. W., ibid., **9**, 117 (1931).

14) Houben, J., Journ. prakt. Chem., **105**, 27 (1922).

15) Smith, R. A., Ph. D., Thesis, New York University, 1929.

16) Soltys, A., see Pregl, F., loc. cit., p. 219.

17) Riesenfeld, E. H. and Schwab, G. M., B., **55**, 2093 (1922).

18) Sanchez, J. A., Anal. Assoc. Quim. Argentina, **13**, 478 (1925).

20) Niederl, J. B., Ztschr. analyt. Chem., **77**, 170 (1929); Mikrochemie, **VII**, 377 (1929).

21) Meyer, V., B., **9**, 1216 (1876); **10**, 2068 (1877); **11**, 1867, 2254 (1878); Ztschr. analyt. Chem., **16**, 482 (1877); **17**, 373 (1878); **18**, 294 (1879).

22) Biltz, H. and Meyer, V., Ztschr. physikal. Chem., **2**, 189 (1888).

23) Lunge, G. and Neuberg, P., B., **24**, 729 (1891).

24) La Coste, W., ibid., **18**, 2122 (1885).

25) Bleier, P. and Kohn, L., Monatsh. Chem., **20**, 505, 909 (1899).

26) Henderson, W. E., Journ. Amer. Chem. Soc., **34**, 553 (1912).

27) Hofmann, A. W., B., **1**, 198 (1868); **9**, 1304 (1876); Ztschr. analyt. Chem., **8**, 83 (1869); **16**, 479 (1877).

28) Porter, C. W., Journ. Amer. chem. Soc., **34**, 1290 (1912).

29) Blackman, Ph., B., **41**, 768, 881, 1588, 2487, 4141 (1908); Journ. physic. Chem., **11**, 681 (1907); **13**, 532, 606 (1909); **15**, 866, 869 (1912); **24**, 225, 266 (1920); Chem. News, **96**, 223 (1907); **97**, 27 (1908); **101**, 121 (1910); **113**, 74, 241, 301 (1916).

30) Dumas, A., Ann. Chim. (2), 33, 342 (1826).

31) Ostwald, W., Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung phys. chem. Messungen, 1893, p. 125.

32) Petterson, V. and Eckstrand, G., B., **13**, 1191 (1880).

33) Biltz, H., Ztschr. physikal. Chem., **2**, 934 (1888); **19**, 415 (1896).

34) Habermann, J., Analyst, **187**, 341 (1877).

35) Routh, I. B., M. Sc. Thesis, New York University, 1930.

36) Siwoloboff, A., B., **19**, 795 (1886).

37) Emich, F., Monatsh. Chem., **38**, 219 (1917).

MICRO VAPOR DENSITY DETERMINATION METHOD.

PART II. ON THE DETERMINATION OF BOILING POINTS.

By

JOSEPH B. NIEDERL and IDA B. ROUTH.*

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College of New York University, New York, N. Y.

(Received May 20, 1932.)

In Part I of this article it was pointed out that in the study of the more extensive applications of the vapor density apparatus, certain observations and suggestions made by ROUTH[1] for the simultaneous determination of the boiling point possessed a high degree of validity. It was suggested that the boiling point be determined in two ways: — first, upon heating, and second, upon cooling. That this is practicable is shown in this communication.

A survey of the literature shows that several micro methods of boiling point determination have been proposed. There is the convenient method of EMICH[2] in which a drop of the liquid to be examined is allowed to rise into a capillary, the tip of which has been drawn out to an extremely hair fine capillary and this capillary end is then so sealed that a small air bubble remains below the thin layer of liquid. This tube is attached to a thermometer and heated in a suitable bath. When the drop of liquid rises to the surface level of the bath, the temperature is read.

In the method of SIWOLOBOFF[3] the liquid is contained in a small tube attached to a thermometer. A capillary sealed at one end is placed, open end downwards, in the liquid in such a manner that air is trapped in the capillary. The temperature at which a rapid, continuous stream of air bubbles passes through the liquid is taken as the boiling point. YAMAGUCHI[4], RICHTER[5] and BILTZ[6] have offered modifications of this method.

---

* This paper includes a portion of the material of a thesis presented by IDA B. ROUTH, for the degree of Master of Science at New York University, in June 1930.

[1] I. B. ROUTH, M. Sc. Thesis, New York University, 1930.

[2] F. EMICH, Monatsh. Chem., 38, 219 (1917).

[3] A. SIWOLOBOFF, B., 19, 795 (1886).

Other methods, notably those of JONES[7] and SCHLEIERMACHER[8] place the sample in the sealed short end of a "I" shaped tube, which is then filled with mercury from the end of the short arm to the bend. The tube is then placed in a heating bath, and the temperature determined at which the meniscus of the mercury rising in the long open arm, and that descending in the closed short arm, pass each other; — that is, are at the same level. In this method alternate heating and cooling allows readings to be checked. However in the SCHLEIERMACHER method about 0,1 gms of material are called for, and no adaption seems to be made for the variation of the volume of vapor formed with substances of different molecular weights. In the JONES method the bath temperature is read; in that of SCHLEIERMACHER the thermometer is suspended in the open arm of the "I" tube.

ARREQUINE[9] modifies the method by placing the sample in a small tube, filling it with mercury, and inverting it in a slightly larger tube containing enough mercury to form a seal. The temperature is read, as before, when the levels of the mercury in the two arms of the vaporization tube are at the same height.

A more recent method is that of SMITH and MENZIES[10]. They point out that there is no method "at once simple and accurate" for boiling point determination, and propose the use of a bulblet attached to a wide capillary, so bent that the stem projects downwards when the bulb is charged. This is attached to a thermometer and placed in a suitable heating bath. When a steady stream of bubbles are discharged through the capillary the temperature is read. On removing the flame a fall in temperature of a fraction of a degree interrupts the stream, and reheating restores it. The process is repeated until constant readings are obtained. The observed temperature is corrected for barometric pressure and immersion depth. The method appears to give very accurate results.

---

[4] YAKUGAKU ZASHI YAMAGUCHI, Journ. Pharm. Soc. Japan, **434**, 252 (1918).

[5] RICHTER, Pharmzeut. Ztg., **56**, 436.

[6] H. BILTZ, B., **30**, 1208 (1897).

[7] JONES, CHAPMAN, J. C. S., **33**, 175 (1878).

[8] A. SCHLEIERMACHER, B., **24**, 944 (1891).

[9] ARREQUINE, Anal. soc. quim. Argentina, **3**, 133 (1915), Anal. chim. appl., **3**, 40 (1921).

[10] SMITH and MENZIES, Journ. Amer. Chem. Soc., **32**, 897 (1910).

Apparatus.

The vapor density apparatus for molecular weight determination first described in 1929[11] and presented as a precision method in Part I of this communication is the basis for the apparatus employed for boiling point determination. It may be used without

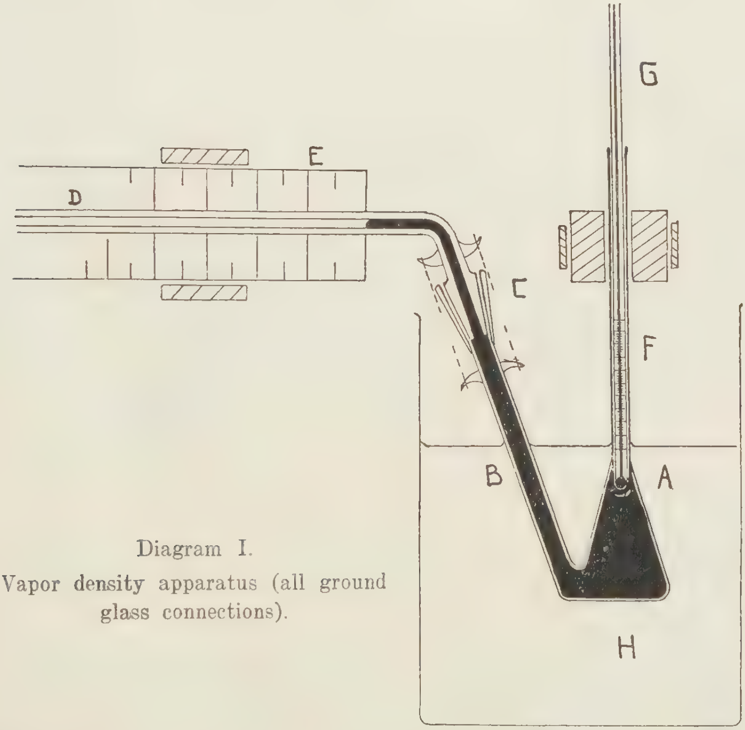


Diagram I.
Vapor density apparatus (all ground glass connections).

---

[11] J. B. **Niederl**, Zeitschr. analyt. Chem., 77, 169 (1929).

modification, or it may be simplified, as shown in the accompanying diagrams I, II, and III, and as described below.

The diameter of the flask is considerably decreased. This requires less mercury for the determination and is equally effective.

The side arm is sealed to the flask, instead of being attached with a ground glass joint. This has proved to be a valuable modification, since it facilitates the filling of the flask, eliminates the danger of cracking at the joint at high temperatures, and removes any possibility of contamination of the contents from stopcock grease. To provide for the introduction of the sample, the side arm is made with a 3 mm diameter instead of 2 mm, and the angle between the side arm and the vertical axis of the flask is about 60°, or 30° from the horizontal axis.

For molecular weight determinations with the above apparatus, as described in Part I of this comminication, the expelled mercury is received in a tared vessel. For determining the boiling point the side arm is attached to a horizontal outlet tube which is paralleled by a reading scale. As heating procedes, the expelled mercury progresses along this outlet tube, and the position of the mercury meniscus can be quickly and easily read on the reading scale. A diameter of 2 mm has been found convenient. It is advisable to keep the bore as small as practicable, in order that the linear measure of mercury displacement may be large. At the same time, if too fine a capillary is used, the time required for the establishment of equilibrium between the vapor pressure within the flask and the atmospheric pressure may cause a slight lag between the scale readings and the corresponding temperature readings.

The horizontal outlet tube may be attached to the side arm by a ground glass stopper, as in diagram I or by rubber tubing as shown in diagram IV.

The rubber connections should be fastened with wire to prevent slipping. Care must be taken to employ a heating bath whose vapors will not affect the rubber.

It is also possible to use an ordinary graduated tube of small diameter set upright, for a receiver. The side arm is extended and bent downwards, to dip into a small amount of mercury in the receiver as a seal, as shown in diagram II.

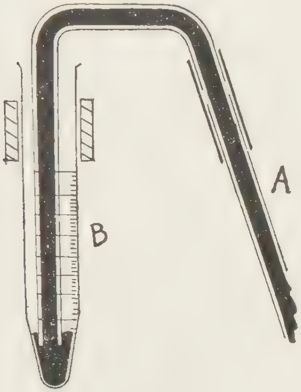


Diagram II.
A: Outlet tube.
B: Receiver.

In the earlier experiments the mercury drops falling per degree rise in temperature were counted, and the boiling point was shown by the maximum fall of drops (diagram III).

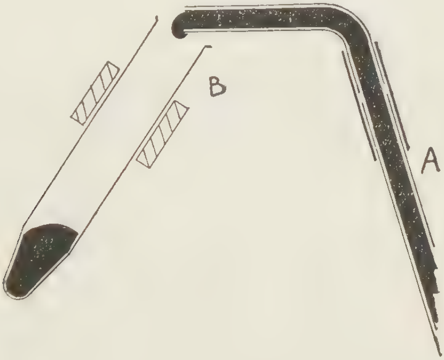


Diagram III.
A: Outlet tube.
B: Receiver.

A thermocouple may be fused into the flask in the region in which the vapor collects, thus measuring the temperature changes in the vapor itself, or a thermometer may be fused directly into the flask.

Procedure.

The sample is introduced in a manner which obviates the difficulty of excluding air bubbles; — a difficulty described at length by JONES[7]. A piece of porous tile of size and shape suitable to pass easily down the side arm is heated in the flame. While still warm it is immersed in the liquid to be examined. The pores of the tile fill completely with the liquid by capillarity. The tile fragment, saturated with the liquid, is dropped down the side arm, and mercury free from volatile matter is run in from a burette. Care is taken that as the mercury fills the flask the tile is floated within the flask, and not within the arm. With such tapping and tilting as may be necessary the apparatus is completely filled with the mercury. If the ground glass connection is used, the horizontal tube is immediately attached, the flask clamped in position in the heating bath and the heating begun.

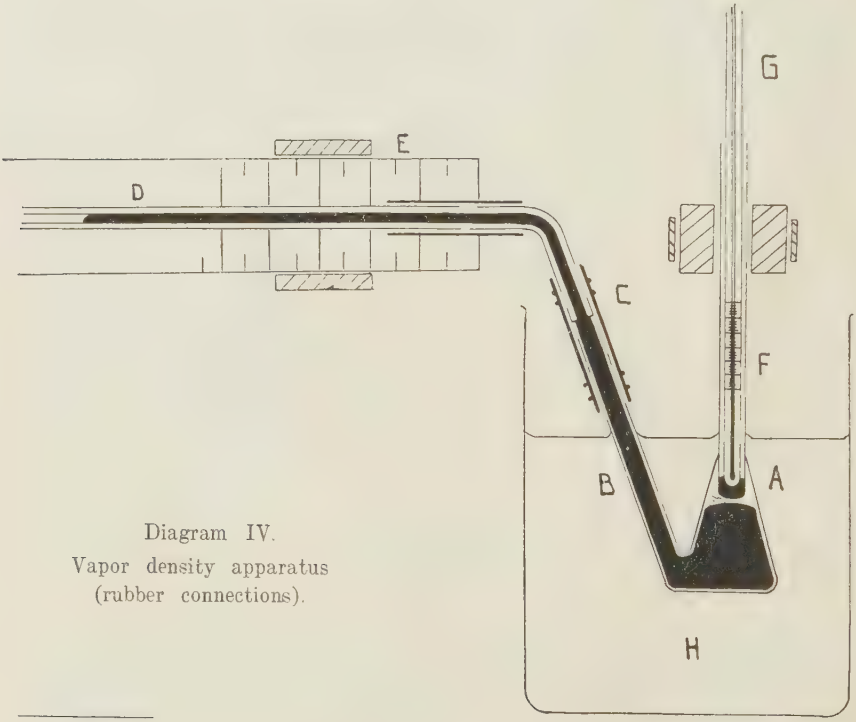


Diagram IV.
Vapor density apparatus
(rubber connections).

---

[7] JONES, CHAPMAN, J. C. S., **33**, 175 (1878).

If the rubber connections are used, the glass bend (see diagram IV) is first filled with mercury by the simple expedient of placing a pinchcock at the more remote end. By tightening the pinchcock when the bend is filled with mercury it may be handled without loss of the contents. Rubber tubing is slipped over the side arm, the bend set in place, the clamp released, and any air bubbles at the connection driven out by tapping. The horizontal tube is now attached, and the flask is clamped in position as before.

The tube designed for the thermometer should contain enough mercury to cover the bulb of the thermometer and to insure proper contact with the flask wall. A small ANSCHÜTZ thermometer was used in the experiments here recorded. This tube furnishes an excellent handle for the apparatus, and by inserting it into a bored cork, an ordinary buret clamp is employed to secure the apparatus.

In place of the porous tile, a capillary similar to that prepared for the molecular weight determinations can be used provided it is short enough to pass into the flask. Asbestos has also been suggested for the purpose instead of porous tile. However, with the capillary, a small air bubble will necessarily be included. Solids may be introduced as single crystals where it is convenient, or as micro pellets, or in capillaries.

For substances boiling below 90°—95° water is suitable for a heating bath. Above this temperature the conventional heating bath liquids such as oil, paraffine, glycerine, sulfuric acid, metal alloys, and air may be used[12]. Wood's Metal was found very satisfactory in this laboratory.

The mercury must be free from volatile organic matter. After using, it may be purified for further use according to some standard manner[13].

After the apparatus has been filled and placed in position, and equilibrium in temperature has been reached in the system, the temperature, and the position of the mercury (as indicated on the reading scale) are noted and heating is begun.

At suitable intervals further readings are made. At first the advance of the mercury will be slow and uniform, since it is due chiefly to the expansion of the mercury itself with heat. At the boiling point the rapid vaporization will cause a sudden and rapid advance of the mercury in the horizontal tube. At this point the heating should be quite slow to insure thermal equilibrium between the thermometer, the mercury in contact with it, and the contents of the flask. While this vaporization occurs the thermometer reading will be constant within 0,2 degrees for low boiling liquids and 0,5° for high boiling substances.

---

[12] J. HOUBEN, Die Methoden der organischen Chemie, Vol. I, p. 654, Verlag G. Thieme, Leipzig 1925.

[13] Handbook of Chemistry and Physics, 16th Ed., p. 1328 (1929).

The apparatus is allowed to cool slowly. For high boiling materials such as thymol a small flame will be necessary to control the rate of cooling. Readings are taken simultaneously, as above, of the temperature and the mercury position. The drop in temperature and the recession of mercury is uniform until the condensation point is reached, at which point the temperature will remain practically constant as before while the gas space disappears.

Thus the temperature at complete vaporization, which forms the basis for the calculation of the true boiling point can be ascertained in the following manners:

1) by visual observation of the formation of the gas space,
2) by the rapid advance of the mercury in the horizontal outlet tube as read on the parallel reading scale,
3) by noting the increase in volume of the expelled mercury in the graduated receiver,
4) by noting the maximum number of drops of mercury expelled per temperature unit,
5) by the constancy of temperature at the point of complete vaporization or condensation.

Calculation of the boiling point.

The apparatus is heated and cooled alternately as many times as may be desired. It is convenient to take readings at fairly wide intervals for the first heatings and coolings and then over smaller and smaller intervals on succeeding runs over the temperature range when vaporization of the sample takes place. The temperature of complete vaporization of the substance under investigation is that temperature at which the portion of the expelled mercury per temperature unit (whole degree or fraction thereof, depending on the desired accuracy) is largest. It is immaterial whether this is determined as a linear measurement of the mercury movement in the horizontal outlet tube as indicated by the reading scale, or by any of the other methods of observation enumerated in the previous paragraph.

Graphical interpretation of the results.

The results obtained by any one of the observation methods mentioned before may be plotted in two different manners as shown in the accompanying graphs. In one case the relationship of the temperature to the total amount of expelled mercury is shown, while in the other the relationship of the temperature to the amount of the expelled mercury per temperature unit (degrees or fraction thereof) is indicated.

For the constant factors during the heating (as the expansion of the mercury itself, the glass expansion, the slight increase in vapor pressure of the substance itself during heating up to the boiling point, and the vapor pressure of mercury) such plots give a smooth curve where $\frac{dy}{dx}$ follows a definite relation. At the point of vaporization, and while the formation of the vapor phase continues, the $\frac{dy}{dx}$ values will change with great rapidity, and the plot will show clearly where this change in slope occurs.

In the determinations given in the experimental part, each run has been repeatedly subjected to heating and cooling. The first observations were preliminaries to determine the temperature range of maximum expansion, and subsequent heating and cooling was to narrow this range to as small a temperature interval as possible. The average run then is represented graphically to show the displacement of mercury with the rise in temperature. The figure taken as the temperature of complete vaporization under the conditions of the experiment is obtained from the curves.

Graph I shows the vaporization curve as obtained upon heating the substance under investigation. The abscissa (x) represents degrees centigrade while the ordinate (y) shows the expansion in centimeters as read on the reading scale. The condensation curves obtained in the cooling experiments are represented in graph II, the abscissa and ordinate carry identical designations and values as the corresponding vaporization curves in the heating experiments.

The heating curve shows three distinct regions. The lower part (with respect to temperature) represents the expansion of mercury. The central portion (with a sharp increase in slope) represents the mercury expansion plus the ejection of mercury by the conversion of the sample to the vapor phase. The third portion, after vaporization is complete, illustrates the expansion of the vapor as well as that of the mercury with increase in temperature. The point of rapid change in curvature after the vaporization range, is taken as the basis for the calculation of the boiling point. In the condensation curve as obtained in the cooling experiments, the above order is reversed and that point is used in the subsequent calculation at which the corresponding change in curvature of the condensation curve occurs.

Another way of plotting the experimental values obtained is shown in graph III (scale reading method) and graph IV (drop counting method). Here the abscissa shows the degrees centigrade, or fractions thereof, while the ordinate gives the values of mercury expansion per temperature unit. In this way distinct peaks are obtained, which represent the point of maximum vaporization, or condensation respectively, and form the basis for the calculation of the boiling point of the substance under examination.

Before the true boiling point of the substance can be calculated the exact pressure (P) under which the vapor of the substance is confined in the apparatus has to be determined.

Determination of the pressure (P):

The pressure of the vapor (P) is composed of the barometric pressure (barometer reading (p_a) to which the temperature correction (p_b) has been applied, (p_b being about —2,6 mm) and the pressure of the mercury column in the capillary outlet tube (p_c) of the apparatus. As this mercury column is within the bath at an elevated temperature, its height in mm must be reduced to its height at 0° C by adding the correction p_d. This correction amounts to about —3 mm for a column 120 mm in height for the temperature interval from 0°—100° C. As the diameter of the horizontal tube is 2 mm, a further pressure correction becomes necessary, namely the correction for capillary depression (p_e). Finally the vapor pressure of the mercury (p_f) at the temperature of complete vaporization must be taken in account.

$$P = p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f$$

After the pressure (P) has been determined the necessary temperature correction is calculated by one of the following equations.

Determination of the temperature correction (C^0):

One of the following standard equations may be used for the determination of the temperature correction (C^0) necessary as the vapors of the substance under the experimental conditions are practically always confined in the apparatus at a higher pressure than 760 mm.

1) In the International Critical Tables[14] the following equation is given:

$$C^0 = \frac{273{,}1 + t^0}{\Phi} (\log_{10} 760 - \log_{10} P \text{ mm})$$

where C^0 is the correction in degrees, t^0 the observed temperature of vaporization, P mm the effective pressure, and Φ a constant characteristic for certain groups of chemically related compounds. Thus the values for the five substances here investigated are as follows:

Ethyl alcohol	= 5,62	Carbon tetrachloride	= 5,2
Aniline	= 5,24	Benzene	= 5,2
Thymol	= 5,75		

2) For small pressure differences, such as will exist in the use of the perpendicular graduated receiver, this equation may be reduced to the rule of CRAFTS[15, 16]

$$C^0 = x\ (760 - p)\ (273{,}1 + t^0)$$

---

[14] CRAGOE, International Critical Tables, Vol. III, p. 246 (1928).

[15] J. M. CRAFTS, B., **20**, 709 (1887).

[16] C. v. RECHENBERG, Journ. prakt. Chem. (2), **101** (1920), 112.

where C° is the correction in degrees, t° the temperature of vaporization observed at the pressure P mm, and x a constant dependent for its value upon the chemical nature of the substance. For this relation, the values of x for the substances investigated are:

Ethyl alcohol	= 0,000096	Carbon tetrachloride	= 0,000118
Aniline	= 0,000113	Benzene	= 0,000122
Thymol	= 0,000119		

3) An even simpler calculation used the correction of — 0,036° per mm of mercury in excess of 760 mm[17]. Then the following simple equation can be applied:

$$C^{\circ} = 0{,}036\ (P - 760)$$

where C is the correction in degrees, P the pressure, and 0,036 the factor given by KAHLBAUM.

4) According to HOUBEN[18] the correction per 1,0 mm above 760 mm pressure is 0,04°.

Where the pressure differences are small, the rule of CRAFTS, and the very simple rules of KAHLBAUM and HOUBEN hold within a reasonable range of accuracy. For wider differences it is better to make use of the more detailed relation, since the constant Φ changes only slightly over the entire range.

The true boiling point of the substance under investigation is finally found by subtracting the above temperature correction (C°) for the excess pressure, from the observed temperature of complete vaporization. It is evident that the conventional stem correction for the thermometer may be further applied in the usual manner.

Results.

Ethyl alcohol.

Ordinary 95% shelf reagent was used. The sample was introduced by means of a small piece of porous tile, as described. The bath was heated rapidly up to about 75° C, and then very slowly. The horizontal outlet tube was employed. Observations were made over the important range as the apparatus was heated, and again as it cooled. Reheating was immediately begun and subsequent cooling allowed. This process was repeated until four runs had been made, which are given in tables Ia and Ib.

---

[17] KAHLBAUM, B., 19, 3101 (1886).

[18] HOUBEN, J., loc. cit.

Table Ia.

Ethyl alcohol.

Heating.

degrees	scale readings (method No. 2)				
centigrade	1st	2nd	3rd	average	$\triangle/1^0$
65	0			0	
70	0,6			0,6	0,12
75	1	1	1	1	0,08
6		1,1	1,2	1,15	0,15
7		1,3	1,3	1,3	0,15
8	1,5		1,8	1,65	0,35
9	2,3	1,8	2,3	2,1	0,45
80			4	4	1,9
1	7,4			7,4	3,4
2					
2,5	31	30,8	30,5	30,7	15,50
3	31,3	31	31,3	31,2	1,0
4					
85	31,3			31,3	0,05

temperature of complete vaporization: 82,5° C.

Table Ib.

Ethyl alcohol.

Cooling.

degrees	scale readings (method No. 2)					
centigrade	1st	2nd	3rd	4th	average	$\triangle/1^0$
85			31,3		31,3	
4	31,6		31,2	31,3	31,3	0,1
3	31,3	31	30,9	30,5	30,9	0,8
2,5	31	30,8	30,5	30	30,5	20,1
2						
1		3,2	4	9	5,4	2,8
80	1,9	2,3	2,3	4	2,6	1

degrees centigrade	scale readings (method No. 2) 1st	2nd	3rd	4th	average	$\Delta/_{1^0}$
9	1,6	1,7			1,65	0,25
8	1	1,5	1,5		1,4	0,1
7				1,3	1,3	0,15
6		1,1	1,2		1,15	0,15
75	1	1	1		1	0,1
70	0,6				0,6	0,1
65	0				0	

temperature of condensation: 82,5° C.

Calculation of the boiling point:

Pressure (P) under which the vapor is confined in the apparatus:

p_a: 744,5 mm
p_b: —2,6 mm
p_c: 120,0 mm
p_d: —3,0 mm
p_e: 8,0 mm
p_f: negligible

$$P:\ p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f = 867 \text{ mm.}$$

Boiling point at 760 mm:

82,5° C observed temperature of complete vaporization (Table Ia)
observed temperature of condensation (Table Ib).
— 3,6° C (temp. correct. accordg. to Cragoe) = 78,9° C
— 3,7° C (temp. correct. accordg. to Crafts) = 78,8° C
— 3,9° C (temp. correct. accordg. to Kahlbaum) = 78,6° C
— 4,3° C (temp. correct. accordg. to Houben) = 78,2° C
reported in the literature: 78,37° C.

Aniline.

Student preparations were twice fractionated and the fraction distilling at $183{,}1^{0}_{756}$ mm was used. Method No. 2 of reading the progress of the mercury in a horizontal outlet tube paralleled by a centimeter reading scale was employed.

Table IIa.

Aniline.

Heating.

degrees centi-grade	scale readings (method No. 2)							
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	average	$\triangle/1^0$
175	0						0	
180	5	5	5	5			5	1
185	21	21	20,6	20	23,5	23	21,5	3,3
6	24	24	26,6	23,2	26	24	24,6	3,1
7	27,5	26,5		26	29		27,2	2,6
8	30	31	36	35,4	35,5	35,8	34,0	6,8
9	33,5	35,5	36,2	36,2	36,2	36,2	35,6	1,6
190	36,5	37,2	36,4	36,5	36,5	36,6	36,6	1
195	38,4						38,4	0,3

temperature of complete vaporization: 188° C.

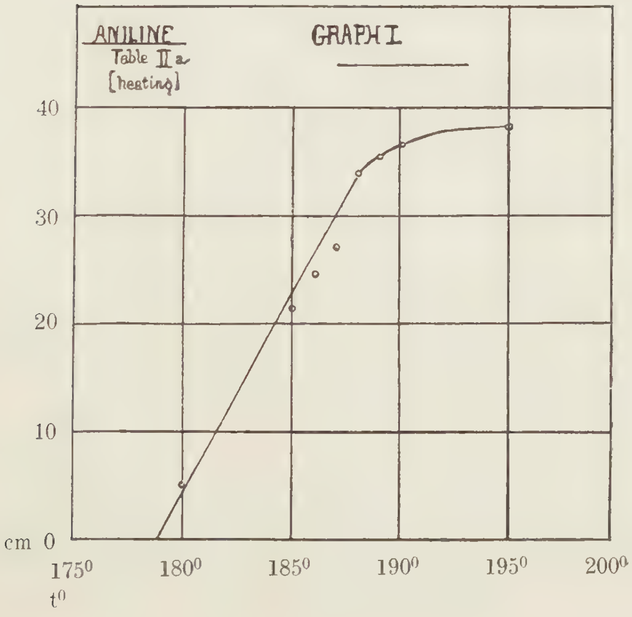


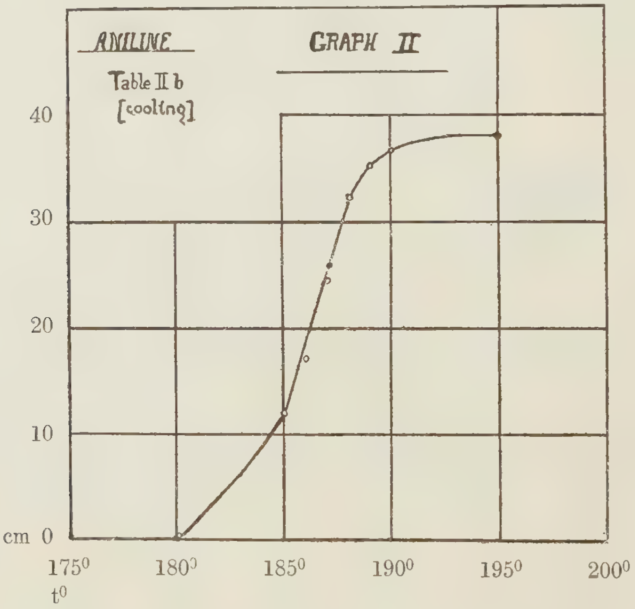
Table IIb.

Aniline.

Cooling.

degrees centigrade	scale readings (method No. 2)							
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	average	$\triangle/1^0$
195	38						38	0,3
190	35	37,2	36,8	36,5	36	36,2	36,3	1,1
9		34,5	35,6	35,5	35,3	35,3	35,2	2,8
8			32	33	32,7	32	32,4	8,0
7		22	24	25	25,9	25	24,4	7,0
6		15,5	17	18	19,5	17,0	17,4	5,4
185		11,5	11,5	13		12	12	2,4
180	0						0	

temperature of condensation: 188° C.



Calculation of the boiling point:

Pressure (P) under which the vapor was confined in the apparatus:

p_a: 750,0 mm
p_b: — 2,6 mm
p_c: 143,0 mm
p_d: — 5,5 mm
p_e: 8,0 mm
p_f: — 12,0 mm

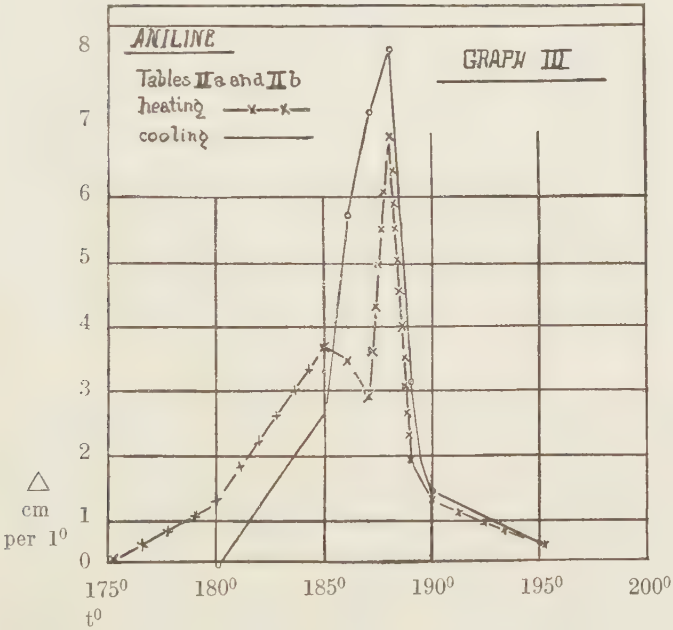
$$P: p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f = 881 \text{ mm.}$$

Boiling point at 760 mm:

188° C observed temperature of complete vaporization (table II a), observed temperature of condensation (Table IIb).

— 5,6° C (temp. correct. accordg. to Cragoe) — 182,4° C
— 6,7° C (temp. correct. accordg. to Crafts) = 181,7° C
— 4,4° C (temp. correct. accordg. to Kahlbaum) = 183,7° C
— 4,8° C (temp. correct. accordg. to Houben) = 184,0° C

reported in the literature 183,7° C[20], 184° C[21], 184,1° C[22], 184,2° C[23].



---

[19] S. W. Winkler, B., 38, 3615 (1905).

[20] Thorpe, Journ. chem. Soc. London, 37, 221 (1880).

[21] W. H. Perkin, ibid., 69, 1207 (1896).

[22] Callendar and Griffiths, Chem. News, 63, 2.

[23] Luginin, Anal. de Chim. et de Phys., (7), 27, 116.

Thymol.

C. P. Thymol (Eastman Kodak product) was used and introduced as one small single crystal. Also in this case method No. 2 was used.

Table III a.

Thymol.

Heating.

degrees centigrade	scale readings (method No. 2)					
	1st	2nd	3rd	4th	average	$\triangle/_{1^0}$
225	0				0	
230	2,1	2,4	2,4	2,2	2,3	0,4
1		2,8	2,9	2,7	2,8	0,5
2		5	4,4	3,7	4,4	1,6
3	21,6	22	20,9	21,2	21,4	17,0
4	24,1	24	23,9	24,2	24,0	2,6
235	27,1	25	24,9	25,7	25,6	1,6
240	28,3				28,3	0,5
245	28,6				28,6	0,06

temperature of complete vaporization: 233° C.

Table III b.

Thymol.

Cooling.

degrees centigrade	scale readings (method Ne. 2)					
	1st	2nd	3rd	4th	average	$\triangle/_{1^0}$
245	28,6				28,6	0,06
240	28,3				28,3	0,5
235	24,8		25,8	26,8	25,8	1,5
4		24,3	23,8	24,8	24,3	3,5
3	21,3	21,3	20,8	19,8	20,8	13,1
2	6,5	8,8	7,8	7,8	7,7	2,4
1	4,3		5,8	5,8	5,3	2,8
230	3,3	2,3	2,3	2,3	2,5	0,5
225	0				0,0	

temperature of condensation: 233° C.

Calculation of the boiling point:

Pressure (P) under which the vapor was confined in the apparatus:

p_a: 750,0 mm
p_b: — 2,6 mm
p_c: 143,0 mm
p_d: — 6,7 mm
p_e: 8,0 mm
p_f: 43,0 mm

$$P:\ p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f = 846 \text{ mm.}$$

Boiling point at 760 mm:

233° C observed temperature of complete vaporization (Table IIIa),
observed temperature of condensation (Table IIIb).

— 4,0° C (temp. correct. accordg. to **Cragoe**) = 229,0° C
— 4,9° C (temp. correct. accordg. to **Crafts**) = 228,1° C
— 3,0° C (temp. correct. accordg. to **Kahlbaum**) = 230,0° C
— 3,4° C (temp. correct. accordg. to **Houben**) = 229,6° C
reported in the literature: 233,5° C[24], 231,8° C[25].

Carbon tetrachloride.

Shelf reagent carbon tetrachloride was fractionated, and the fraction distilling at 76° was taken for this experiment. The temperature of maximum displacement of mercury was determined by counting the drops of the metal falling from the outlet tube per degree rise in temperature. Four samples were so run. The results are given graphically to demonstrate the constancy of results with different samples of the same substance.

---

[24] Perkin, Journ. chem. Soc. London, **69**, 1183 (1896).

[25] Pinette, Anal., **243**, 46 (1888).

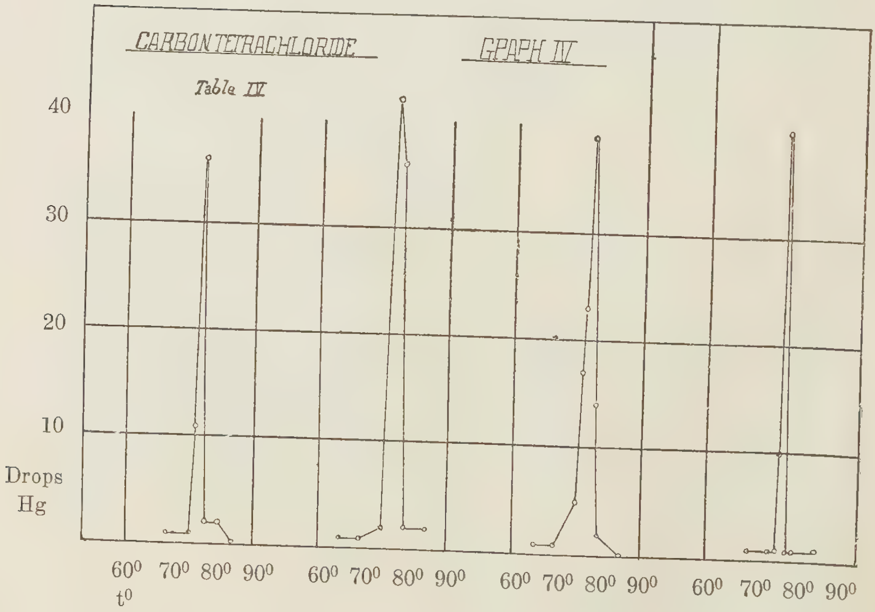
Table IV.

Carbon tetrachloride.

Heating.

degrees centigrade	Drops of mercury per 1^0 increase in temperature (method No. 4)				
	1st sample	2nd sample	3rd sample	4th sample	average
71	1	1	1	1	1
72	1	1	1	1	1
73	1	1	1	1	1
74	1	5	5	1	3
75	1	2	5	1	2
76	1	2	17	1	5
77	11	30	23	10	18
78	36	42	37	38	38
79	2	36	14	2	13
80	2	2	2	1	2
85	0	2	0		1

temperature of maximum displacement: 78° C.



Calculation of the boiling point:

Pressure (P) under which the vapor is confined in the apparatus:

p_a: 768,0 mm
p_b: — 2,6 mm
p_c: 31,0 mm
p_d: — 1,0 mm
p_e: negligible
p_f: negligible

$$P:\ p_a + p_b + p_c + p_d + p_e - p_f = 800 \text{ mm.}$$

Boiling point at 760 mm:

78,0° C observed temperature of complete vaporization (Table IV).

— 1,56° C (temp. correct. accordg. to CRAGOE) = 76,44° C
— 1,65° C (temp. correct. accordg. to CRAFTS) = 76,35° C
— 1,40° C (temp. correct. accordg. to KAHLBAUM) = 76,60° C
— 1,60° C (temp. correct. accordg. to HOUBEN) = 76,40° C

reported in the literature: 76,74° C[26, 27].

Benzene.

Redistilled commercial benzene was used in the experiments given in Tables Va and Vb. A graduated centrifuge tube was used as the receiver. The receiver contained some mercury into which the vertical capillary outlet tube was immersed. Under these experimental conditions the application of the various pressure corrections was unnecessary.

Table Va.

Benzene.

Heating.

degrees centigrade	volume readings (method No. 3)				
	1st	3nd	3rd	average	$\Delta/1^0$
75	0	0	0	0	
77			2	2	1
78	4,0	4	4	4	2

---

[23] THORPE, Journ. chem. Soc. London, **37**, 199 (1880).

[27] S. YOUNG, ibid., **59**, 912 (1886).

degrees rentigrade	volume readings (method No. 3)				
	Ist	3nd	3rd	average	$\Delta/1^0$
79	7	8	7,5	7,5	3,5
80	14	13	17	14,7	7,2
80,2	15	19	19	17,7	15
80,4	20			20	11,5
81		22,5		22,5	4,8
82		23		23	1

temperature of maximum displacement: 80,2 — 80,3° C.

Table Vb.

Benzene.

Cooling.

degrees centigrade	volume readings (method No. 3)			
	1st	2nd	average	$\Delta/1^0$
82	23	23	23	1
81	22	22	22	8,5
80,6	21,5		21,5	2,5
80,4	21		21	30
80,2	15	15	15	7,5
80	13	14	13,5	6,5
79	7	7	7	1,2
75	0	0	0	

temperature of maximum contraction: 80,2 — 80,3° C

Calculation of the boiling point:

With the graduated tube receiver the mercury within the flask and within the receiver can be brought to the same level. Hence the vapor is under atmospheric pressure and only the corrections p_a and p_b are the ones to be considered. Therefore under these experimental conditions the temperature of maximum displacement (Table Va) and the temperature of maximum contraction (Table Vb) is identical with the true boiling point of the substance.

Boiling point at 760 mm: 80,2 — 80,3° C

reported in the literature: 80,18° C[28], 80,2° C[29], 80,36° C[30].

---

[28] E. C. Young and Fortey, ibid., **83**, 58 (1910).

[29] Luginin, Anal. de Chim. et de Phys., (7), **13**, 332.

[30] Regnault, Jahresbericht, **1863**, p. 70.

Summary.

A further application of the vapor density apparatus for boiling point determinations is described and its merits and limitations may be given as follows:

1. The boiling point of a pure substance may be determined sharply. For substances which are not pure, the results plotted graphically show not only the boiling point of the chief substance, but the entire boiling range. It is suggested that the possibilities of the apparatus with regard to the study of mixtures may prove interesting.
2. The apparatus works equally well for liquids and solids. The only limitations as to its application are that at temperatures at which the vapor pressure of mercury itself becomes very appreciable, the determinations may not give such clear cut results, and that it is not applicable where the substance to be investigated reacts with mercury.
3. Very small amounts of material (a few milligrams) may be accurately investigated.
4. The possibility of repeating the heating and cooling many times offers opportunity for increasing precision with each run, as already mentioned.
5. The apparatus is very simple and of low cost.

Studies as to possible further improvement of the method are being continued.

THE QUANTITATIVE, MICRO ANALYTICAL DETERMINATION OF CARBON AND HYDROGEN IN AN ATHMOSPHERE OF NITROGEN.

By

JOSEPH B. NIEDERL and BRADLEY WHITMAN.*

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University, New York, N. Y.

(Received May 20, 1932.)

It is still generally acknowledged that the most important analytical method in organic chemistry, the quantitative determination of carbon and hydrogen, has not the simplicity and ease of operation so desirable in a method of such tremendous importance. Starting with LAVOISIER's[1] ingenious apparatus with the subsequent improvements by GAY-LUSSAC and THÉNARD[2], BERZELIUS[3] and especially LIEBIG[4] and others[5, 6] the process is still tedious. As a result the average organic chemist is tempted to resort to the more indirect although far less reliable methods rather than employing the absolute quantitative gravimetric determination of carbon and hydrogen.

With the introduction by PREGL[7] of micro analytical methods, an adequate micro method for the determination of carbon and hydrogen came into existance. In this procedure the corresponding macro method was followed quite faithfully. With the exception of a better regulation of the combustion gases, few fundamental changes were made, and the defects of the macro method were therefore not eliminated. Used by an experienced micro analyst this method will unquestionably give satisfactory results. Opinions vary as to the actual precision obtainable[8, 9, 10] but it is reasonable to expect the same accuracy as in the corresponding macro method[11].

---

* This paper represents the thesis presented by BRADLEY WHITMAN, in partial fulfillment for the degree of Master of Science at New York University in May 1932.

[1] LAVOISIER, Mem. de l'Acad., 448 (1781), 593 (1784).

[2] GAY-LUSSAC and THENARD, Rech. chim.-phys., 2, 265 (1811); Anal. de chim., **74**, 47 (1810), **95**, 184, **96**, 53 (1815).

[3] BERZELIUS, Thomsens Anal. of phil., **4**, 401 (1814), **5**, 93, 174, 260, 273 (1815).

[4] J. LIEBIG, Poggendorffs Annal. (1831).

[5] HESS, ibid., **46**, 179 (1839).

[6] O. L. ERDMANN and R. F. MARCHAND, Journ. prakt. Chem. (1), **27**, 129 (1842).

[7] F. PREGL, Quantitative organic micro analysis, 2nd edition, P. Blakiston's Sons and Co., Philadelphia (1930).

Since the introduction of this method in 1912[12] a large amount of literature[13, 14] has appeared, proposing modifications and improvements. Some of these brought a number of interesting facts to light and several heretofore obscure sources of error were more thoroughly studied and remedies attempted. Among other things, these studies showed that the lead super oxide used in the PREGL universal combustion tube filling was responsible for errors of relatively great magnitude. The investigations by LINDNER[15] and FRIEDRICH[16] proved that lead super oxide is capable of absorbing considerable carbon dioxide which is then gradually eliminated when the lead super oxide is heated or when it is taking up the acidic combustion products formed in the oxidation of substances containing nitrogen, sulphur, or halogen. BOETIUS[17] found that the lead super oxide also retains some of the water formed in the combustion as well as carbon dioxide. The absorbed water, since

---

[8] H. LIEB, Abderhalden, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Vol. IX, p. 675 (1919).

[9] B. FLASCHENTRÄGER, Ztschr. angew. Chem., **39**, 719 (1926).

[10] F. BÖCK and K. BEAUCOURT, Mikrochemie, **VI**, 133 (1928).

[11] J. HOUBEN, Die Methoden der organischen Chemie, Georg Thieme, Leipzig (1925).

[12] F. PREGL, loc. cit., p. 21.

[13] M. BOETIUS, Über die Fehlerquellen bei der mikroanalytischen Bestimmung des Kohlen- und Wasserstoffes nach der Methode von FRITZ PREGL, Verlag Chemie, Berlin (1931).

[14] C. WEYGAND, Quantitative analytische Mikromethoden der organischen Chemie, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig (1931).

[15] J. LINDNER, Ztschr. analyt. Chem., **66**, 305 (1925).

[16] A. FRIEDRICH, Mikrochemie, **X**, 342 (1931).

[17] M. BOETIUS, loc. cit., p. 57.

it is only gradually eliminated gives rise to serious deviations in the hydrogen values. The time and amount of gas specified by PREGL for the purpose of sweeping out the combustion gases appears to be insufficient for the complete removal of the water.

It was natural, therefore, that a micro method should be sought at this time, which would eliminate or at least lessen the undesirable effects of the lead super oxide. Several attempts were made to replace this reagent by some other suitable substance. PERKIN[18] tried replacing the lead super oxide first used by KOPFER[19] in macro analysis by both manganese dioxide and potassium dichromate. DENNSTEDT[20] suggested metallic silver while KLINGEMANN[21], TOWER[22] and others proposed metallic copper, which is the most efficient agent for reducing the oxides of nitrogen. The combustion taking place in oxygen, necessitated the introduction of a new copper spiral for each determination. A method by BENEDICT[23] consisted of combusting a weighed sample of high carbon content before combusting containing nitrogen. In this way the combustion of the first sample produced the copper needed to reduce any oxides of nitrogen formed from the second.

FRIEDRICH'S[24] suggestion of combusting the substance catalytically in an atmosphere of oxygen, thus making it possible to renew more frequently the lead super oxide contained in two boats. as in the semi-micro method of DENNSTEDT[25] appeared to be a step towards improvement, as far as this phase in the method of PREGL is concerned. Numerous experiments of our own, however, showed that the method is not as reliable as PREGL'S and that only by exercising extreme care is it possible to prevent substances such as naphthalene from passing through the hot combustion tube unchanged. The reasons for this are quite obvious and were pointed out by NIEDERL[26]. If the volumes of the gases formed and the gases necessary for the combustion are calculated, it can be seen that the combustion tube is by far too small to insure an adequate supply of oxygen at all times during the combustion. Even starting with a small sample and carrying out a stepwise combustion in such a way that only small portions are oxidized at a time did not completely remove the uncertainty in the case of the more volatile and subliming substances. Substances which normally combust slowly give satisfactory results.

---

[18] PERKIN, Journ. chem. Soc. London, **37**, 121, 457 (1880); B., **13**, 581 (1880).

[19] F. KOPFER, Ztschr. analyt. Chem., **17**, 28 (1878).

[20] DENNSTEDT, Gaz., **28**, 78 (1898).

[21] KLINGEMANN, B., **22**, 3064 (1889).

[22] O. F. TOWER, Journ. Amer. chem. Soc., **21**, 596 (1899).

[23] BENEDICT, ibid., **23**, 334, 343 (1900).

[24] A. FRIEDRICH, loc. cit.

[25] M. DENNSTEDT, Ztschr. angew. Chem., 462 (1897); B., **30**, 1590, 2861 (1897).

Having experienced the relative unreliability of the catalytic combustion, the suggestion made by Dr. A. A. BENEDETTI-PICHLER of this laboratory, that the combustion be carried out in an atmosphere of nitrogen was investigated. As pointed out by NIEDERL this permits the unrestricted use of the more efficient and less disturbing metallic copper instead of the conventional and troublesome lead super oxide. Serious objections may be raised to the use of an inert gas in the combustion of organic compounds. However there are already methods in existence which do not use oxygen or air for the combustion: for example, those combustions carried out in a vacuum[27, 28, 29]. Another satisfactory combustion in an inert atmosphere is the DUMAS[30] method for the gasometric quantitative determination of nitrogen in organic substances, although in this case it has apparently never been determined whether complete oxidation to carbon dioxide and water takes place.

AVERY, BRACKENBURY and MACLAY[31] mention the use of nitrogen in a micro carbon and hydrogen determination but since oxygen and air are also used no conclusions concerning the completeness of the combustion in nitrogen alone can be drawn from their work.

In as much as the micro DUMAS method as devised by PREGL[32] has been thoroughly studied and found satisfactory, it was decided to make it the basis for the method used in this work. Of especial importance was the work of FLASCHENTRÄGER[33], BÖCK and BEAUCOURT[34], HALLA[35], HERNLER[36], HEIN[37], BERL and BURKHARDT[38], DUBSKY[39], BLAU[40], DENNSTEDT[41], NIEDERL[42], TRAUTZ[43, 44] and others[45, 46] on the most efficient location of metallic copper: i. e., whether placed in the beginning, middle, or end of the copper oxide layer. The results of their findings indicated that the arrangement used by PREGL was at least as satisfactory as any of the proposed changes and it was therefore incorporated in the tube filling used in this work. Thus there is sufficient copper oxide preceeding the copper layer to completely oxidize the substance. When the combustion gases pass over the copper layer all oxides of nitrogen are reduced. Any carbon monoxide formed has ample opportunity to be oxidized by the copper oxide following the copper layer. Suitable agents for the removal of halogens (metallic silver [47, 48, 49]) and sulphur (lead chromate[50, 51]) are placed in the combustion tube at what seemed to be the most suitable position. In the apparatus as well as the method, it was thought desirable to retain as much as possible the standard PREGL equipment and technique.

---

[26] J. B. NIEDERL, Ztschr. analyt. Chem., 89, 57 (1932).

[27] H. HEMPEL, Ztschr. analyt. Chem., **17**, 409 (1878).

[28] E. P. FRANKLAND, Journ. chem. Soc. London, 99, 1783 (1911).

[29] A. KROGH, Biochem. Ztschr., **221**, 247 (1930).

[30] DUMAS, Ann. chim. Phys., II, 198 (1831).

[31] AVERY, BRACKENBURY and MACLAY, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **4**, 238 (1932).

[32] F. PREGL. loc. cit., p. 81.

---

[33] B. FLASCHENTRÄGER, loc. cit.

[34] F. BÖCK and K. BEAUCOURT, Mikrochemie, **VI**, 69 (1928).

[35] F. HALLA, ibid., VII, 202 (1929).

[36] F. HERNLER, ibid. PREGL-Festschrift, p. 141 (1929).

[37] F. HEIN, Ztschr. angew. Chem., **40**, 864 (1927).

[38] E. BERL and H. BURKHARDT, B., **59**, 897 (1926).

[39] V. DUBSKY, Vereinfachte quant. Mikro-Elementaranalyse org. Substanzen, Leipzig (1917).

[40] F. BLAU, Monatsh. Chem., **13**, 279 (1892).

[41] M. DENNSTEDT, Entwicklung der org. Elementaranalyse, Stuttgart (1899), p. 42.

[42] J. B. NIEDERL, O. R. TRAUTZ and WM. J. SASCHEK, This Journal, EMICH-Festschrift, p. 219 (1930).

[43] O. TRAUTZ and J. B. NIEDERL, Ind. Chem. Anal. Ed., **3**, 151 (1931).

[44] O. TRAUTZ, Mikrochemie, **X**, 299 (1931).

[45] H. MEYER, Analyse und Konstitutionsermittlung organ. Verbindungen, J. Springer, Berlin (1903), p. 123—129.

[46] J. HOUBEN, loc. cit., p. 45.

[47] K. KRAUT, Ztschr. analyt. Chem., **2**, 242 (1863).

[48] STEIN, ibid., **8**, 83 (1869).

[49] V. MEYER and WACHTER, B., **25**, 2632 (1892).

[50] CARIUS, Ann. Chim. Phys., **116**, 28 (1860).

[51] V. MEYER and O. STADLER, B., **17**, 1577 (1884).

In addition to the elimination of the undesirable lead super oxide the method described in this paper offers other advantages. The apparatus has been simplified by eliminating the second gas train used by PREGL. The time required for combustion has been shortened and the recommended treatment of the absorption tubes has distinct advantages.

The experimental results given indicate that it is possible to carry out the quantitative determination of carbon and hydrogen in organic substances in an atmosphere of nitrogen, regardless of whether the substance is solid or liquid, whether it is easy or difficult to combust. The presence of other elements such as nitrogen, halogen, sulphur, or metals does not interfere with the analysis in any way.

In addition to the primary purpose of this work, the elimination of the troublesome lead super oxide, studies of the functions and properties of the various oxidizing and absorption agents under these new conditions will be continued. An investigation of the properties of copper oxide, especially its hydroscopicity, would establish whether or not it could be used for ultra combustions. Professor F. EMICH's[52] opinion is, that the ultra micro analysis must be of a simpler nature than the micro methods used at present. The elimination of the lead super oxide is certainly a step in this direction.

As this is the first detailed account of a micro combustion method in nitrogen alone, it is quite evident that years of practical application will bring about improvements. The method itself will not only prove adaptable to the gravimetric barium carbonate method of NIEDERL and MEADOW[53], but can also be used for titrimetric estimation of the carbon dioxide making use of the work of LINDNER[54], LIEB[55], and others[56, 57] for the quantitative absorption and titration of this acid. Also LINDNER's[58] titrimetric method for the determination of hydrogen as hydrochloric acid can easily be adapted with advantage for the method set forth herein.

---

[52] F. EMICH, private communication.

[53] J. B. NIEDERL and J. R. MEADOW, Mikrochemie, **X**, 350 (1931).

[54] J. LINDNER, Ztschr. analyt. Chem., **66**, 305 (1925).

[55] H. LIEB and H. J. KRAINICK, Mikrochemie, **IX**, 367 (1930).

[56] E. SCHADENDORF and M. K. ZACHERL, ibid., **X**, 99 (1931).

[57] M. NICLOUX, Compt. rend. Acad. Sciences, **184**, 890 (1927).

In the titration methods for the quantitative determination of the combustion gases, the micro chemical balance is used for weighing the sample only. NIEDERL and co-workers[59], SASCHEK[60] and others[61, 62] have shown that it is possible by applying the equation of BAULE and BENEDETTI-PICHLER[63] to mix the sample with substances such as copper oxide or sodium sulfate, or dissolve it in a suitable solvent and use as samples aliquote portions weighed on a macro balance. Thus the use of a micro chemical balance can be completely eliminated, making possible the use of this method outside the micro chemical laboratory.

Apparatus and reagents.

Nitrogen Supply and Preheater.

Instead of the two gas containers required for the PREGL procedure one for oxygen and one for air, only a single tank of nitrogen (a) is needed. Whether or not the gas must be precombusted before using can be determined by blank runs.

The precombustor used in this work consisted of an ordinary PREGL[64a] combustion tube. A 15 cm layer of wire form copper oxide is placed in the tube about 10 cm from the open end and is heated by a wing top Bunsen burner. The other end of the tube is cooled by a water condenser.

With this set-up no trouble was experienced by impure nitrogen or the rubber connections giving off organic material. Since the gas control can be adequately regulated by the reducing valves on the tank, there is no need of using a precision pinchcock and the

---

[58] J. LINDNER, Mikrochemie, **X**, 321 (1931).

[59] J. B. NIEDERL, O. R. TRAUTZ and WM. J. SASCHEK, loc. cit.

[60] WM. J. SASCHEK, Ind. Eng. Chem., Anal Ed., **3**, 198 (1931).

[61] M. NICLOUX, Compt. rend. Soc. Biol., **96**, 1416 (1927), **102**, 693 (1929); Compt. rend. Acad. Sciences, **184**, 890 (1927).

[62] A. BOIVIN, Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 1069 (1929).

[63] B. BAULE and A. BENEDETTI-PICHLER, Ztschr. analyt. Chem., **74**, 442 (1928).

[64a] F. PREGL, loc. cit., p. 104.

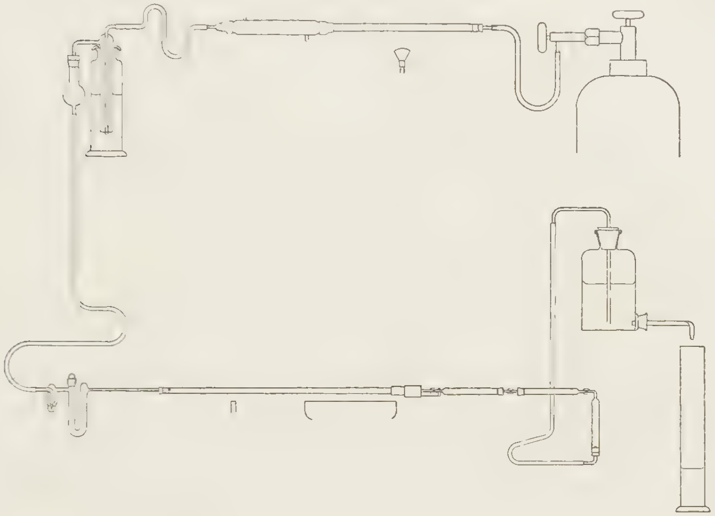


Figure 1.
Apparatus for Carbon- and Hydrogen determination.

precombustor can be directly connected to the pressure regulator by glass tubing. This eliminates considerable rubber tubing from the apparatus, thus minimizing one of the factors which contribute to high blank results.

Pressure Regulator.

The pressure regulator (b) is the usual sort consisting of a bell tube and a wide mouth glass bottle[64b]. A gas inlet tube, extending a few mm. below the open end, and a gas outlet tube are sealed into the closed end of the bell tube. The glass bottle is filled with a strong solution of potassium or sodium hydroxide, then the bell tube placed in it. The alkali serves a double purpose. It removes any traces of carbon dioxide in the nitrogen and lowers the vapor pressure of the water. Consequently the ascarite tube will not have to be refilled so often. The latter connects directly with the pressure regulator and will remove most of the moisture and any traces of carbon dioxide not already taken care of by the alkaline solution in the pressure regulator.

[64b] F. PREGL, loc. cit., p 18.

The height of the solution in the regulator is so adjusted that the nitrogen flows through the combustion tube at the rate of about 5 cc. a minute. If a side-arm combustion tube is used, the ascarite tube is directly connected to the bubble counter by glass tubing. But if the older type tube is employed, it should be connected to the bubble counter with about 15 cm. of rubber tubing in order to give flexibility to the apparatus.

Bubble Counter.

The bubble counter and drying tube (c) has a somewhat larger chamber of calcium chloride than the tube described by Pregl[64c]. Also, the outlet tube is made of capillary glass tubing so that the unit connects directly with the combustion tube, not as in Pregl's apparatus, with an intermediate length of rubber and capillary tubing. A small amount of 50% potassium hydroxide is put into the bubble counter. The drying tube is filled with calcium chloride which has preciously been heated in a porcelain dish over an open flame or in vacuum.

Filling the Combustion Tube.

This tube (d) is of standard dimensions and should be made of quartz or supremax glass.

The following chemicals are used in the filling of the combustion tube:

1. Copper oxide-wire form. Made for Pregl analysis by Merck, Darmstadt. Before using, it is slightly crushed in a mortar and then sieved to remove any fine powder.
2. Copper oxide-powdered. This can be made from any wire form copper oxide by boiling it with successive portions of water, until the wash liquid is neutral. It is then ground in a mortar and heated in an iron crucible over a roaring Bunsen flame. Probably because there was considerable unoxidized copper present, the mass became hard when heated and had to be ground and heated over again.
3. Lead chromate. Made for Pregl analysis by Merck, Darmstadt.

[64c] F. Pregl, loc. cit., p. 21.

4. Metallic copper. Merck's wire form copper oxide was broken up in a mortar and sieved. After reduction the resulting product will pack nicely in the combustion tube and offer a large surface to the passing gases.
5. Silver. A fine silver wire was used, but the silver wool made for this purpose would have served as well.
6. Asbestos. Commercial purified Gooch crucible asbestos was used for packing between some of the layers in the tube. Before putting it into the tube, the asbestos is ignited to red heat in a strong Bunsen flame.

Procedure for Filling the Combustion Tube.

The combustion tube should be cleaned with sulfuric-chromic acid cleaning solution, rinsed first with water, then distilled water, then alcohol and finally dried under suction with gentle heating.

After this has been done, silver wire is introduced, into the tube, filling it for a length of 15 mm. If several strands are twisted together in such a way that the twisted part extends almost through the small bore outlet tube, it will keep any water vapor from condensing in this unheated portion of the tube.

Next a layer of about 70 mm. of fine wire form copper oxide is inserted. There is no need to put partitioning material between the copper oxide and the silver. Thus, most of thet tube heated by the constant temperature device as well as an additional two cm. heated by the large burner contain copper oxide. Any carbon monoxide which may be formed when the combustion gases pass over the copper layer will be oxidized by the copper oxide under conditions practically identical with those which Pregl[64d] found ideal in the cases of the Dumas nitrogen determination.

A small asbestos wad is packed against the copper oxide, then the next 30 mm. of the tube are filled with a mixture of equal parts of lead chromate and wire form copper oxide—made up as directed by Pregl[64e].

Then comes another small asbestos plug and a 60 mm. layer of wire form copper oxide. A wad of silver is packed firmly against the latter. To conserve space in the tube, this and the following plugs are made of silver wire rather than asbestos and are about 5 mm. thick.

[64d] F. Pregl, loc. cit., p. 84.

[64e] F. Pregl, loc. cit., p. 29.

Next a 30 mm. layer of copper is put in, followed by a silver plug. This copper should be so located that the gases after passing over it have to traverse a relatively large portion of the tube heated by the large burner. Copper reduces the oxides of nitrogen much more efficiently than lead super oxides will absorb them. Hence it is not necessary here to precede the copper with a heavy asbestos layer like the one preceding the lead super oxide in the PREGL tube.

A 115 mm. layer of wire form copper oxide is next. If the sample is to be introduced in a boat, an additional layer of about 15 mm. of powdered copper oxide is added. If it is mixed with copper oxide before putting it in the tube, the wire form copper oxide is held in place by an asbestos plug.

Before using the tube, it should be thoroughly burned out for several hours, the constant temperature device removed and that portion of the tube heated with a Bunsen flame.

With each analysis, especially if the substance is volatile or subliming, a small amount of the copper oxide filling will become reduced and eventually the tube will have to be regenerated. This can be done in one of two ways. The used portions can be removed and replaced by fresh wire form copper oxide. A somewhat more convenient method is to pass oxygen through the tube and heat to a red heat for a few minutes the used up portion of the filling.

Heating devices.

Three units are used for heating the combustion tube, a movable Bunsen burner (e), a large burner (f), and the constant temperature device (g)[64f, 65]. The uses of the first two need no explanation. The constant temperature device is retained, even though no lead super oxide is used as it is necessary to reduce the temperature from that over the large burner to one above the boiling point of water and yet well below the temperature at which the rubber connection to the calcium chloride tube might be damaged. In this work the constant temperature device was filled with p-cymene but

---

[64f] F. PREGL, loc. cit., p. 31.

[65] A. VERDINO, Mikrochemie, **IX**, 123 (1931).

since the maintenance of a constant temperature is not so important as in the PREGL tube any liquid boiling between 130 and 180° C. should be just as satisfactory. It should be possible to use a much simpler arrangement than the constant temperature device, for instance, a metal tube which would conduct enough heat from the large burner to maintain the temperature in the end of the combustion tube between the above mentioned limits.

For most of this work the constant temperature device was employed. Toward the end, however, it was discarded and the simpler device (Fig. 2) was used. This consists of a 6 cm. length of copper or brass tubing, of such a diameter that the combustion tube will just pass through it. The attachment for holding the wire which heats the capillary constriction of the calcium chloride tube is made from a piece of sheet copper 35 mm. wide and about 100 mm. long. One end of this is wrapped around the heating wire forming a small cylinder which is then attached by bending the other end around the copper tube and binding it in place with wire. Fitting over the end of the tube is a piece of sheet copper with a hole in the center through which protrudes the constricted end of the combustion tube. The other end of the copper tube is heated by the large burner for a length of about 1 cm. and enough heat is conducted by this device to keep the water from condensing in the end of the combustion tube.

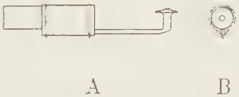


Figure 2.
Heating device.
A: front.
B: cross section.

Absorption tubes.

The absorption tubes (h) are the usual ones with a hollow ground glass stopper at one end[66]. Undoubtedly a self-sealing tube could be used, either the mechanical type of FRIEDRICH[67] and others[68, 69] or the mercury seal type described by KEMMERER and HALLET[70] and CORNWELL[71]. If a self-sealing tube were used it could be weighed filled with nitrogen but the method recommended and to be described later has certain advantages which it is believed more than outweigh this convenience.

---

[66] F. PREGL, loc. cit., p. 37.

Both the absorption tubes are equipped with a slight modification of the copper wires as described by BOETIUS[72]. These are made by placing copper wires slightly larger than the capillary constrictions in the ends of the absorption tube, in nitric acid until the diameter is reduced enough to just allow the wire to pass through these constrictions. Instead of the beads attached to the ends of these wires which BOETIUS recommends to distinguish the two sets apart, they can be made of different lengths. A loop is placed in the end in such a way that when the wire is inserted in the absorption tube it will slide in until the loop is close to the first capillary constriction. With the wires fitting in this manner, they may be inserted immediately after the connecting tubes have been cleaned and the absorption tubes wiped and weighed with them in place. They can easily be removed with a stiff wire having at one end a small right angle bend. This is hooked through the loop and the wire pulled out. These wires cut down tremendously the diffusion of gases in to the tubes. BOETIUS[72] has shown that if the diameters of capillary constrictions are 0,05, 0,07, 0,10, 0,15, 0,20 mm. then the respective cross

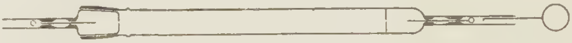


Figure 3.
Absorption tube.

---

[67] A. FRIEDRICH, Mikrochemie, **X**, 329 (1931).
[68] J. V. DUBSKY, B., **50**, 1710 (1917).
[69] B. FLASCHENTRAEGER, Ztschr. angew. Chem., **39**, 720 (1926).
[70] G. KEMMERER and L. F. HALLET, Ind. Eng. Chem., **19**, 173 (1927).
[71] R. T. K. CORNWELL, ibid. Anal. Ed., **3**, 4 (1931).
[72] M. BOETIUS, loc. cit., p. 100.
[72] M. BOETIUS, loc. cit., p. 100.

section areas are in the ratio of 1 : 2 : 4 : 9 : 16. Thus a capillary of 0,1 mm. diameter allows only one quarter of the moisture to pass through that the usual one of 0,2 mm. permits, while for one of 0,07 mm. the value is only one eighth of the latter. Consequently the change in weight on standing is much less when the wires are used.

The absorption tubes are filled as directed by PREGL[73a]. The precautions to be observed are that the calcium chloride must be heated over an open flame just prior to using it and the tube after filling must be saturated with carbon dioxide. Soda lime was used in preference to ascarite as tubes filled with the former seemed to give more constant weights.

Mariotte flask.

This is used[73b] to overcome the pressure drop through the absorption tubes. It also affords an easy way of measuring the volume of the gas flowing through the apparatus.

Suction device.

The suction device is simply a Mariotte flask[73b] kept in the balance room. When the tubes are removed at the completion of combustion they are attached to the suction device and air is sucked through them in the same direction as it passed during combustion. An air purifier must be prepared containing ascarite and calcium chloride and having an outlet tube of the same diameter as the connecting tubes of the absorption apparatus so that it can be attached to the calcium chloride tube and thus remove all moisture and carbon dioxide from the air before it is drawn through the absorption tubes.

Rubber connection.

Before any rubber tubing was used it was treated with alkali and steamed out, as described by A. FRIEDRICH[74]. PREGL's[75] directions were followed for treating rubber stoppers and the rubber connections used for attaching the absorption tubes. The latter should be thick-walled tubing of about eight mm. outside diameter and 2 mm bore. After treatment it is well to cover the tubing with gummed paper to give it additional rigidity.

[73a] F. PREGL, loc. cit., p. 43.

[73b] F. PREGL, loc. cit. p. 42.

[74] A. FRIEDRICH, Ztschr. angew. Chem., 36, 481 (1923).

[75] F. PREGL, loc. cit., p. 51.

If an arrow is marked on each one indicating the direction of the gas flow, the same end will be connected to the same tube each time, and the rubber tubing will be worn to fit the end of the absorption tube fitting into it. These rubber connections were kept in a dessicator over phosphorus pentoxide as recommended by BOETIUS[76].

Preparation of sample for analysis.

In this analytical procedure there are two quite different methods of introducing solid samples. They may be inserted in a boat or mixed with copper oxide and poured into the tube in the manner of the DUMAS nitrogen determination[77a]. Liquid samples are introduced in capillaries containing a little potassium chlorate[77b].

a) Introduction of sample in a copper boat.

When this method was first studied it was thought necessary to mix all substances with copper oxide before putting them into the tube so that there would be an oxidizing agent in contact with the sample. For this reason it was dangerous to use a platinum boat since it might be damaged because of alloy formation with the copper which would be present if any of the sample were oxidized in the boat. A copper boat was tried but it had two disadvantages arising from the copper oxide coating formed when after cleansing the boat was held in a flame. This coating changed in weight with each cleaning and the counterpoise for one determination was of little use for the next. In addition to this it was quite possible to lose some of the oxide coating when the boat was removed from the balance to introduce the sample. To overcome this the boat was weighed on an small copper tray and the sample put in. Using this procedure the weighings were perfectly reliable but it was rather hazardous to attempt the removal of some of the sample if too much had been added as some of the copper oxide coating might also be removed. Consequently the copper boat was discarded in favor of a porcelain one.

---

[76] M. BOETIUS, loc. cit., p. 106.

[77a] F. PREGL, loc. cit., p. 88.

[77b] F. PREGL, loc. cit., p. 62.

b) Introduction of sample in a porcelain or platinum boat.

While experimenting with a porcelain boat, sucrose was used and consistently low results were obtained. It was evident that the mixing procedure which consisted of adding powdered copper oxide to the weighed sample and mixing the two with a small copper wire which was left in the boat, was inadequate. A larger porcelain boat was tried but the results were still low. Furthermore, it appeared that for volatile or subliming substances there was no need of adding copper oxide. This was tried and the results were satisfactory. If the sample were to be introduced without copper oxide, it is possible to use a platinum boat.

In an attempt to bring about the complete combustion of sucrose in a porcelain boat stronger oxidizing agents than copper oxide were used. Potassium chlorate or a mixture of potassium chlorate and copper oxide when mixed with sucrose gave erratic results. Using potassium dichromate, a knife edge full placed on the sucrose in the boat, a less violent combustion took place but the results were not satisfactory.

c) Direct introduction of sample mixed with copper oxide.

When it was found that sugar could not be completely combusted by the boat method already described, the mixing method was studied since in this procedure the sample was intimately mixed with a large amount of copper oxide and the opportunity for complete combustion much enhanced. The combustion tube filling in this case is slightly different. There is no fine copper oxide in the permanent filling and the last layer of wire form copper oxide is held in place by an asbestos plug.

For weighing the sample, the weighing tube used for the Dumas nitrogen determination was tried but it was found that it required considerable time to reach a constant weight. Furthermore, wiping out the mixing bottle with cotton was out of the question in a carbon and hydrogen determination. Thus it was necessary to clean and thoroughly dry the mixing bottle before each determination or run the risk of copper oxide adhering to the side of the weighing tube when the sample was introduced. These small errors may not make much different in the DUMAS determination where the usual sample seldom runs as high as 30% nitrogen but in a carbon and hydrogen determination where a sample containing 80% carbon is by no means unusual, they make a great difference.

In an effort to find a more convenient procedure, the following was tried. The sample was weighed in a porcelain boat and the boat introduced into the mixing bottle. Two cubic centimeters of copper oxide, which is about 100 times the amount needed for the combustion of a 5 mg. sample of naphthalene, were added, the tube closed with a ground glass stopper and shaken thoroughly. The combustion tube was disconnected and removed from its stand and into the end was placed a funnel with a stem long enough to reach within 3 cm. of the asbestos plug. The contents of the mixing tube were poured into the funnel. Thus the mixture of copper oxide and substance is delivered directly to the part of the combustion tube which is thoroughly heated during the analysis. This does away with the danger of particles adhering to the walls near the mouth of the tube where they will not be heated during the combustion. By tapping the funnel all the copper oxide passed through but the stem was too small for the boat. The boat was then carefully returned to the mixing bottle with forceps making certain that no copper oxide was adhering to it. About 1 cc. of fine copper oxide was added and the mixing tube thoroughly shaken. The contents were poured down the funnel and the boat washed again in the same way. The copper oxide used for mixing gave perfect carbon blanks so that the excellent carbon values obtained by this method leave no doubt that the combustion was complete.

To shorten the time required for weighing the sample a platinum scoop as shown in Fig. 4 was used instead of the porcelain boat. The scoop is made by cutting the end from a platinum boat and a triangular piece from each of the two long sides. The procedure followed is identical with the one given for the porcelain boat.

To avoid the necessity of cooling the combustion tube after every analysis and removing it from the stand each time a sample was to be introduced, a combination of the boat and mixing methods was tried. For this a copper tube about 3 to 4 cm. long and of such a diameter that it would easily fit into the combustion tube was used. One end was closed so that it would hold the copper oxide mixings. The substance was mixed just as described above, poured into the tube through a short stem funnel and the tube then inserted in the combustion chamber. Since the slightly low

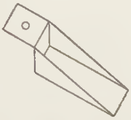


Figure 4.
Weighing scoop.

results might be due to the combustion gases being retained in the cylinder, a slit was cut the length of the tube so that all gases would have a chance to escape. The results were still low but slightly better than in the previous case. Further studies will be made on this method not only using copper oxide but other oxides which are not basic enough to retain carbon dioxide, as for example manganese dioxide and cerium dioxide.

In the previously described mixing methods it was not difficult to get perfect carbon blanks but the calcium chloride tube always showed an increase in weight. This occurred despite the fact that the mixing bottle and funnel were kept in a desiccator over phosphorus pentoxide and the copper oxide used was perfectly dry. To be certain of the latter, the copper oxide was put in the combustion tube and heated until a blank determination gave no increase in water before it was used. This trouble with the copper oxide powder was quite unexpected.

It was found in the course of these experiments, that copper oxide which gave high water values in one blank would, if it was not removed from the tube, give a perfect water blank on the next run. This fact suggested the following procedure which gave quite satisfactory results.

The combustion tube is filled just as in the previously described mixing method. A layer of about 4 cm. of powdered copper oxide is added. This copper oxide should not be so fine that it will greatly reduce the gas flow through the combustion tube. Before using the tube the first time the tube and especially the copper oxide powder are thoroughly burned out. The sample is weighed in the platinum scoop and the scoop placed in the combustion tube so that it is touching the copper oxide. The combustion tube is removed from the supporting stand and held in the vertical position, thus dumping the contents of the scoop on the copper oxide. The platinum wire hook used for removing the boat from the combustion tube, is used here to hook the boat, which is vigorously shaken and then removed. So far in using this method there has been no indication that any of the sample was removed with the boat. The sample is now intimately mixed with the copper oxide. For this a platinum wire about 1 mm. in diameter and long enough to reach the asbestos layer is used. The end is hammered flat for a length of about 3 cm. This flattened end is forced into the copper oxide and rotated. Repeating this six or eight times has given adequate mixing. The tube is now filled and ready for the combustion.

d) Introduction of liquid samples.

Liquid samples are weighed in capillaries containing a small amount of potassium chlorate fused in one end just as described by Pregl[77b]. The filled capillary is introduced into the combustion tube on a piece of copper or platinum foil.

e) Recommended procedures.

For unknown samples or samples which will leave a carbonaceous residue on heating: — The procedure recommended is the one previously described in which the substance and copper oxide are mixed in the combustion tube. Briefly the steps are: weighing the sample in a platinum scoop, introducing the scoop into the combustion tube, removing the tube, removing the scoop after shaking the sample out, and finally mixing the sample and copper oxide with a platinum wire. Several precautions should be observed. When shaking the boat keep it as close as possible to the copper oxide so that any of the sample adhering to the walls of the tube will be removed by the copper oxide during the mixing. Just prior to introducing a sample, heat both the platinum wires and allow them to cool so that they will be perfectly dry when used.

For volatile or subliming substances: — The recommended procedure is the one in which the substance is weighed in a boat, the boat introduced into the combustion tube and shoved in until it is in contact with the fine copper oxide layer. It must be remembered that if a porcelain boat is used, it requires about fifteen minutes to reach equilibrium after cleaning. The safest procedure is to weigh the empty boat to a constant weight. After the sample has been introduced, the boat is placed in the balance for several minutes before taking the weight.

Method.

The procedure given here is for carrying out an analysis after the sample has been already introduced.

With the sample introduced and the combustion tube in place, the bubble counter is connected and the air in the tube washed out with nitrogen for five minutes. Then the large burner and constant temperature device are lighted.

Attachment of absorption tubes.

After weighing, the copper wires are removed from the absorption tubes. The two tubes are then connected together. They are then attached to the combustion tube, making sure that glass to glass connections prevail throughout. After the Mariotte flask is connected to the end of the soda lime tube and the gas flow adjusted, the combustion can be started. In this work a gas flow of 5 cc. per minute was used.

The combustion.

The combustion is started using a small Bunsen flame applied about 3 cm. from the sample. The burner is slowly moved forward until it is next to the large burner. The rate at which the burner is advanced is such that a gas flow of 5 cc. a minute is maintained The flow of gas is more easily observed by using the bubble counter as a speed indicator. The second combustion, which takes place during the passage of the next 25 cc. of nitrogen is carried out just as before, except this time the flame is increased and the copper oxide filling and boat (if one was used) are heated to a red heat. It is sometimes necessary to warm the unheated capillary constriction of the calcium chloride tube to keep it from being clogged with water. The combustion is now complete. It remains to wash the last traces of carbon dioxide and water vapor from the tube. This requires an additional 25 cc. of nitrogen.

In this connection Boetius[78] has shown that considerable air in excess of the 100 cc. used by Pregl is required for the complete removal of all the water from the lead super oxide layer. By avoiding that troublesome substance in this method it is possible to obtain the complete removal of the water from the combustion tube in a shorter time. In addition to this there is another reason why in the Pregl method the amount of air cannot be cut down. In that procedure the absorption tubes are weighed in air which necessitates a complete washing out of oxygen from all the apparatus past the three way stopcock, in order to be sure that the oxygen in the absorption tubes has been completely displaced by air.

In this method the tubes are also weighed filled with air, but here the nitrogen is replaced by rapidly sucking purified air through the absorption tubes only after they have been removed from the combustion tube and not as in the other method where the oxygen is expelled while the tubes are still attached. This procedure is more rapid for two reasons. First, only the gases in the absorption tubes need be replaced and not all the gases in the bubble counter, combustion tube and absorption tubes. Second, the air is washed through at a rate of about 25 cc. a minute while in the Pregl procedure it is about 4 cc. a minute.

The following is a summary of the amount of gases passing through the tube and the time required for the two methods:

	Pregl method[79a]			Nitrogen method		
	cc. of O_2	cc. of air	time: minutes	cc. of N_2	cc. of air	time: minutes
Combustion proper . . .	75		19	75		15
Washing out comb. gases .		100	25	25		5
Replacing N_2 in absorption tubes by air					50	2
Total	75	100	44	100	50	22

---

[78] M. Boetius, loc. cit., p. 62.

[79a] F. Pregl, loc. cit., p. 49.

The bubble counter is much more regular in this combustion than in the Pregl method. The reason for this will be seen in the following example. A 5 mg. sample of naphthalene requires about 37 cc. of oxygen for complete oxidation and will produce 44 cc. of combustion gases at 700 C. and yet the total volume of an empty combustion tube is only about 25 cm^3. It is obvious then, that in the Pregl tube there cannot be present sufficient oxygen at the moment of combustion to completely burn the substance, and that the oxidizing must be done for the most part by the lead chromate-copper oxide mixture. When this first oxidation takes place there is an increase in pressure within the tube and the bubble counter slows up. When the combustion gases are swept out, the oxygen comes in contact with the reduced portion of the filling and reoxidizes it causing the bubble counter to speed up. Thus in the Pregl tube there are two processes taking place and each one disturbs the pressure conditions within the tube. In the method described herein there is only one, that of the substance being oxidized by the copper oxide. Furthermore the pressure increase within the tube is not so great since the elimination of the large asbestos plug proceeding the lead super oxide layer used by Pregl[79b] reduces the gas resistance of the tube filling.

At the end of the combustion proper, that is when 75 cc. of nitrogen have passed through the compustion tube, the Bunsen burner is turned off if the next sample is to be introduced in a boat. However if the mixing method is to be used, all burners are extinguished so that the tube will cool sufficiently for the introduction of the next sample.

Removal of absorption tubes.

When the final 25 cc. of nitrogen has been passed through, the Mariotte flask is disconnected from the soda lime tube and the two tubes removed still connected together. The purifying tube, containing ascarite and calcium chloride is immediately attached to the free end of the calcium chloride tube, and the three taken to the balance room and connected to the suction device. Fifty cc. of air are sucked throught at a rate of 25 cc. a minute in the same direction as the gases passed during combustion. The advantages of this method are: first, the tubes are filled with air much more quickly than in the PREGL method; second, they are cooled to balance room temperature at the same time the nitrogen is washed out, as a result of which they give quite constant weighings.

[79b] F. Pregl, loc. cit., p. 23.

After the 50 cc. of air have been sucked through, the suction flask is disconnected and the connecting tubes are cleaned with cotton. The copper wires are inserted in the capillary constrictions in which position the tubes can be wiped with the wires in place. BOETIUS[80] recommends their use only while the tubes are on the rack, that is between the time they are wiped and the time they are out in the balance. The procedure used in this work of having the wires in place during both wiping and weighing can be seen to have certain advantages over the one suggested by BOETIUS.

During the early part of this investigation, the absorption tubes were weighed filled with nitrogen. The results (Table A) were satisfactory but the removal and weighing of the tubes required considerable care. The best results were obtained with the following procedure. When the Mariotte flask was disconnected, the capillary end of the soda lime absorption tube was cleaned with cotton and the copper wire inserted. The tubes still connected together were removed from the combustion tube, the free end of the calcium chloride tube cleaned and its wire inserted. They were then taken to the balance where the two remaining connecting tubes were cleaned and the wires put in place. They were then ready to be wiped.

Wiping the tubes.

The absorption tubes are wiped as directed by PREGL[81]. If the tubes are to be weighed filled with nitrogen it is necessary to note the time at which the calcium chloride absorption tube was wiped

Weighing the absorption tubes.

When the tubes are weighed filled with nitrogen the time factor is quite important. Ten minutes after it has been wiped, the calcium chloride tube is placed in the balance. Precisely fifteen minutes after wiping the weight is taken. The soda lime tube is then placed in the balance and its weight is taken twenty minutes after wiping the calcium chloride tube. The disadvantage of this method is that the tubes continuously change in weight but by taking the weights at time intervals given above satisfactory results can be obtained.

---

[80] M. BOETIUS, loc. cit., p. 100.

Weighing the tubes filled with air is a more reliable method, since once they have become constant they will remain constant for some time. In this procedure, the calcium chloride tube is placed in the balance ten minutes after wiping and about five minutes later it is weighed. The soda lime tube is put in the balance for a few minutes and its weight is taken. The tubes are now weighed in rotation until they both become constant.

It is not necessary to use the copper wires in the capillary constriction and instead the procedure described by PREGL[81] may be employed.

Results.

Table A.

Blank determinations — absorption tubes weighed filled with nitrogen.

	$CaCl_2$ tube		Soda lime tube		Change in weight	
Run	start	finish	start	finish	$CaCl_2$ tube	Soda lime tube.
1	1,97 mg.	2,01 mg.	2,01 mg.	2,00 mg.	+ 0,04 mg.	— 0,01 mg.
2	4,69	4,74	2,67	2,67	+ 0,05	0,00
3	0,31	0,34	57,51	57,54	+ 0,03	+ 0,03
4	0,43	0,42	57,56	57,56	— 0,01	0,00

Table B.

Blank determinations — absorption tubes weighed filled with air.

	$CaCl_2$ tube		Soda lime tube		Change in weight	
Run	start	finish	start	finish	$CaCl_2$ tube	Soda lime tube.
1	1,54 mg.	1,52 mg.	3,14 mg.	3,14 mg.	— 0,02	0,00
2	1,52	1,51	3,14	3,14	— 0,01	0,00
3	1,51	1,51	3,14	3,14	0,00	0,00

---

[81] F. PREGL, loc. cit., p. 35.

Table C.

Analytical results — substance introduced in porcelain boat — mixed with copper oxide absorption tubes weighed filled with nitrogen.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
Azo benzene . . .	79,15	5,33	79,12	5,49	+ 0,03	— 0,16
P nitro brom benzene	35,62	2,04	35,64	1,98	— 0,02	+ 0,06
Di benzyl sulfide . .	78,48	6,66	78,50	6,54	— 0,02	+ 0,12
Sucrose	37,12	6,45	42,11	6,43	— 4,99	+ 0,02
	38,80	6,52			— 3,31	+ 0,09

Table D.

Analytical results — sucrose introduced in porcelain boat and covered with oxidizing agent other than copper oxide — tubes weighed filled with air.

Substance	Oxidizing agent	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
Sucrose	$K_2Cr_2O_7$	30,71	6,57	42,11	6,43	— 11,40	+ 0,14
Sucrose	$KClO_3$	41,00	6,45			— 1,22	+ 0,02

Table E.

Analytical results — sample introduced in porcelain boat — no copper oxide mixed with sample — absorption tubes weighed filled with air.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
P nitro bromo benzene	35,70	2,00	35,64	1,98	+ 0,06	+ 0,02

Table F.

Analytical results — sample mixed with copper oxide in mixing bottle and poured into combustion tube — absorption tubes weighed filled with nitrogen.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
Azo benzene . . .	79,13	5,60	79,12	5,49	+ 0,01	+ 0,11
Sucrose	42,04	6,55	42,11	6,43	— 0,07	+ 0,12

Table G.

Analytical results — Same as above only absorption tubes weighed filled with air.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
Dibenzyl sulfide . .	78,69	6,63	78,50	6,54	+ 0,19	+ 0,09
Sucrose	42,09	6,78	42,11	6,43	— 0,02	+ 0,35

Table H.

Analytical results — substance mixed with copper oxide in the combustion tube — absorption tubes weighed filled with air.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
Sucrose	42,14	6,50	42,11	6,43	+ 0,03	+ 0,07

The results in the following table were obtained by students in the micro analytical course given at this institution. They represent the first and second attempts by students who never before have performed a micro carbon and hydrogen determination, and the results are given merely to indicate the simplicity of the method.

Table J.

Analytical results — substance introduced in platinum boat — Absorption tubes weighed filled with air.

Substance	Found (%)		Calculated (%)		Error (%)	
	C,	H,	C,	H,	C,	H,
Urea	19,70	6,71	20.00	6,67	— 0,30	+ 0,04
	20,06	6,67			+ 0,06	0,00
	19,85	6,91			— 0,15	+ 0,24
	19,76	6,79			— 0,24	+ 0,12
	20,00	6,67			0,00	0,00
	19,74	6,63			— 0,26	— 0,04
	19,93	6,39			— 0,07	— 0,28
	19,98	6,70			— 0,02	+ 0,03

Summary.

A method for the gravimetric, quantitative micro analytical determination of Carbon and Hydrogen in organic compounds in an atmosphere of Nitrogen has been developed.

It was established, that organic compounds could be combusted quantitatively in an inert atmosphere. This fact made possible several advantageous changes in procedure and reagents.

The experiments are being continued.

A DISTILLATION METHOD FOR THE RAPID DETERMINATION OF THE VOLATILE CONSTITUENTS OF SMALL SAMPLES OF COPPER-ZINC ALLOYS.

By

LILY I. WEINSTEIN[1] and A. A. BENEDETTI-PICHLER.

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University, New York, N. Y.

(Received May 20, 1932.)

Introduction.

Due to the great difference in their vapor pressures at high temperatures, zinc and copper can be separated and the zinc in a copper-zinc alloy can be determined directly or indirectly by volatilization and weighing the distillate or the copper residue, provided there is some means of preventing the oxidation of the metal to be weighed. The directions which may be found in the literature of the last seventy years use one of two methods for preventing the oxidation, namely: heating the alloy imbedded in charcoal or distilling in vacuum

A method belonging to the first group was described by PERCY[2] in 1861. He mentiones the method as having been used before but gives no references. In 1873 MAKINS[3] described a method in which the alloy is mixed with twice its weight of tin and is strongly heated in an assay muffle for eight hours. Using a temperature of 1375° C. ROSE[4] was able to cut down the time required for a determination on a one gram sample from 8 to 2 hours. But SHIBATA and KAMIFUKU[5] contend that the temperature used by ROSE was too high and caused loss of copper. Working at a temperature not higher than 980° C. and using a sample of 0,5 g. to which an equal weight of tin was added, they also took advantage of the low volatility of tin and its tendency to form alloys with copper, thereby replacing the zinc in the original alloy.

---

[1] This paper includes a portion of the material of a thesis presented by LILY WEINSTEIN in partial fulfillment for the degree of Master of Science at New York University, in May 1932.

[2] J. PERCY, Metallurgy: Fuel, Copper, Zinc, etc. (London 1861), p. 956.

[3] G. H. MAKINS, Manual of Metallurgy (Philadelphia 1873), p. 524.

[4] T. K. ROSE, Journ. Soc. Chem. Ind., 33, 170 (1914).

In all the methods thus far mentioned, the alloy was weighed at the beginning, imbedded in charcoal and heated. After the zinc had been driven off, the residual metal was picked out of the charcoal, cleaned and weighed. The necessity for cleaning the surface of the residual metal button already obviates the possibility of using such a procedure on a micro scale.

A method for the separation of copper and zinc by heating in a vacuum was described by TURNER[6] in 1912. His experiments were performed as follows. The alloy was weighed in a porcelain boat and then the latter introduced into a porcelain tube. The tube was closed, exhausted and heated. By the aid of a thermocouple, care was taken that the temperature did not rise more than a few degrees above the melting point of the copper. Heating for 45 minutes gave a clean cut separation of zinc and copper, the results checking within 0,1 or 0,2% abs. with those obtained by the usual analytical methods. Besides it must be mentioned that the directions worked out by TURNER were based on an extensive study of the behaviour of alloys at high temperatures, an investigation which will be mentioned again. In 1927 POLANYI and BOGDANDY[7] patented an apparatus for the determination of zinc based upon the same principle. The distillation of the zinc is carried out at 1100° C. The seperation is extremely rapid, taking only a few minutes for a sample of 0,15 to 0,2 g.

It is obvious that any method utilizing a vacuum will of necessity require a more or less complicated set-up. Therefore an improvement toward simplicity was expected from the substitution of an inert gas for the vacuum, provided that the inert gas can be easily obtained in a state of sufficient purity. Accordingly the general idea, upon which the experiments described in this paper have been based, was to place the weighed alloy into a tube of clear fused quartz and then volatilize the zinc by heating in a current of inert gas which also serves to keep low the partial pressure of the zinc above the alloy and therefore hasten the volatilization of the zinc. Using samples of only a few milligrams weight, it was reasonable to expect that the separation of zinc and copper would take place in a short time. For the inert gas hydrogen[8] was selected mainly because of its strong reducing action, which eliminates the necessity of removing the last traces of air or oxygen. The excess of hydrogen present is sufficient to hinder the oxidation of the residual metal.

---

[5] T. SHIBATA and B. KAMIFUKU, Mem. College Sci., Kyoto Imp. Univ., **8**, 167 (1925).

[6] T. TURNER, Journ. Inst. of Metals, **7**, 105 (1912).

[7] M. POLANYI and ST. V. BOGDANDY, Ztschr. Metallkunde, **19**, 164 (1927); Metal Ind. (London), **31**, 195 (1927); German Patent 449.973, Kl. 40b, Sept. 30, 1927.

Since the sought-for constituent (or the residue) is weighed directly, errors in weighing have a great influence upon the result when working with very small samples. A simple calculation shows that weighing errors of 0,005 mg. (which the working conditions did not permit avoiding) may cause deviations between 0,1 and 0,4% (absolute) in the results when working with samples of about 2 mg. weight. Furthermore when considering the practical use of the method, it did not seem desirable also for other reasons to attempt to obtain a high degree of accuracy. A clean cut separation by volatilization of the zinc can be expected only in the case of a straight copper-zinc alloy. As soon as other constituents are also present the problem becomes complex. Some constituents will remain quantitatively with the copper, some will volatilize quantitatively with the zinc and others will partially volatilize, the weight of the residual fraction depending upon the duration and temperature of the distillation. The following limitations of the method may be listed:

---

[8] In this connection it may be mentioned that T. K. NAIR and T. TURNER, Journ. chem. Soc. London, **103**, 1534 (1913), conducted experiments to demostrate the increase in temperature necessary for the volatilization of zinc with an increase in gas pressure. They found the minimum temperature necessary to cause an appreciable volatilization of the zinc to be 460° C. in vacuum. This critical temperature was found to be raised by gaseous pressure and the effect of low gas pressures was found most marked. The initial temperature was raised less by carbon monoxide than by air, and still less by hydrogen. In pure hydrogen of 20 mm. pressure it was 600° C. and at 50 mm. it was 690° C.

1. It is obvious, that all of the constituents of an alloy, which possess a lower boiling point than zinc (i. e. below 929° C.), may volatilize quantitatively or partially with the latter: sodium (877°), potassium (757°), rubidium (696°), cesium (670°), cadmium (770°), mercury (357°), arsenic (616°) and phosphorus (287°). In spite of their high boiling points lead (1525°) and bismuth (1420°) possess a sufficiently high vapor pressure to also volatilize.

2. The reduction of oxides and the decomposition of sulfides present in the sample may increase the loss of weight.

3. The solubility of hydrogen in the residual metal is negligible. But due to the ability of the alkali metals and calcium, strontium and barium to form hydrides on heating in a hydrogen atmosphere, alloys containing these metals cannot be fractionated in a hydrogen atmosphere.

4. Incomplete volatilization of the zinc (lead, bismuth) in case the temperature is too low or the time of heating too short. The volatility of the zinc can be decreased by formation of a compound with another constituent (gold, magnesium) of the alloy.

5. Volatility of the copper or other "non-volatile" metals must become noticeable on prolonged heating at high temperature. No matter how low the temperature used for driving off the zinc, the other metals will also exert a certain vapor pressure and part of them will volatilize.

6. Presence of constituents which volatilize only partially thus making the results inconclusive (arsenic in copper alloys).

Some of these limitations are obvious from the stand point of our present knowledge, some of them are explained by the results obtained by earlier investigators. Rose (l. c.) using a temperature of 1375° C. found that 0,03% zinc remains with the residue and that the amounts of copper and tin which are lost by volatilization vary with the temperature. The experiments of Shibata and Kamifuku (l. c.) indicate that the vapor pressures of lead and iron are high enough at 980° C. to influence the results but not high enough to give a quantitative volatilization under the experimental conditions used by the Japanese investigators. Based on an extensive investigation of the volatility in vacuum GROVES and TURNER[9] distinguish the following groups of alloys:

1. Alloys not volatile in vacuum at 1200° C.: Copper-aluminium, copper-nickel, copper-tin, copper-iron.

2. Alloys which permit a quantitative separation of their constituents:

a) Copper-zinc. A 5 g. sample of an alloy containing 70% copper and 30% zinc gave a yield of 29,94% zinc in 30 minutes at 1100° C.

b) Copper-lead. A 2 g. sample of an alloy containing 74,6% copper and 25,32% lead gave a quantitative separation in 45 minutes at 1100° C.

c) Copper-bismuth. A 1 g. sample containing 75% copper and 25% bismuth gave a quantitative volatilization of the bismuth in 30 minutes at 1100° C.

d) Zinc and lead were separated from iron at 500° C. Above this temperature the iron also comes off.

e) Lead and tin (E. TIEDE and F. FISCHER, Ber., Dtsch. Chem. Ges., **44**, 1711 [1911]).

3. Alloys permitting only a partial volatilization of the volatile constituents. The rest is held back by the formation of a non-volatile compound as AuZn, AuCd, $MgZn_2$, Cu_3Sb. No volatilization takes place, of course, when the volatile constituent is not present in excess in the original alloy.

4. Alloys which retain a volatile constituent partially. When heating a copper-arsenic alloy (19,5% arsenic) part of the arsenic was retained. GROVES and TURNER explain this by the assumption of the formation of a non-volatile compound at high temperature.

5. Alloys which cannot be analysed because both constituents show volatility: Lead-zinc (?), silver-zinc, silver-lead.

---

[9] C. R. GROVES and T. TURNER, Trans. Chem. Soc. (London), **101**, 585 (1912).

Experimental Part.

First a description of the final apparatus and procedure shall be given. Samples of 1 to 3 mg. of the alloy were weighed into a micro porcelain boat (20 × 5 × 5 mm.) as obtainable from the Staatliche Porzellanmanufaktur in Berlin. The boat with the alloy was introduced into the middle of a micro combustion tube of clear fused quartz, 8 mm. bore and 35 cm. length. The tube was tapered on one end and finally drawn out to a capillary of 0,5 to 1 mm. bore and about 10 mm. length, which served as an outlet for the hydrogen. The other end of the combustion tube was closed by means of a rubber stopper and the inlet tube for the hydrogen. The combustion tube was fixed in a horizontal position near the rubber stopper in a clamp which kept it at the proper level for the electric resistance tube furnace.

The hydrogen was generated by the action of hydrochloric acid on metallic zinc in a Kipp apparatus. The gas was washed once with dilute sodium hydroxide solution (colored by addition of an indicator) and then filtered through a plug of cotton wool, the latter inserted into the inlet tube mentioned above. Thus also dust from the rubber tubing used for the connection was prevented from entering the quartz tube. The rubber tubing between the wash bottle and the quartz tube was thin walled and had about 1 m. length and 3 mm. bore in order to give the quartz tube sufficient freedom of motion.

After inserting the boat and connecting with the wash bottle, the quartz tube was flushed with hydrogen. When it was certain that the air had been expelled completely, the hydrogen supply was cut down until no more than 2 bubbles per second passed the wash bottle. Then the tube was placed into the electric furnace by moving the supporting stand. The furnace had been heated previously to the proper temperature (1150° C.). A tube furnace of 23 cm. length was used so that about 8 cm. of the inlet end of the quartz tube and also its tapered outlet were not exposed to the heat.

It required several minutes for the tube and contents to acquire the temperature of the furnace. Therefore it also took a few minutes before a condensate could be observed at the outlet end of the tube.

After 10 minutes heating the quartz tube was taken out of the furnace and allowed to cool. Five minutes after this the hydrogen stream was shut off and the porcelain boat was taken out of the tube by means of a platinum hook and transferred onto the copper block of a „PREGL" desiccator. After 10 minutes cooling in the desiccator and then 5 minutes standing on the balance pan the boat was weighed again. The whole procedure, heating, cooling and weighing, was repeated in the majority of cases to constant weight.

The metallic residue in the boat has the form of a tiny ball which can be easily removed from the boat by means of a foreceps. If it has not been touched with the fingers, the boat is then ready for weighing in the next sample. It must not be cleaned by the usual procedure of boiling with nitric acid, rinsing with distilled water and then drying and igniting in a Bunsen flame, because it was found that in this case the boat then changes its weight on heating in a hydrogen atmosphere. Every porcelain boat used must be previously heated in the current of hydrogen and cooled exactly as when carrying out a determination. It seems reasonable to assume that this precaution could be avoided by using boats of clear fused quartz.

The following experiments may be reported to illustrate the applicability of the method and its limitations.

1. The weight of a sample of pure copper remained constant after heating for 10 minutes at 1150° C.

2. A 2 mg. sample of the purest zinc obtainable was heated in the furnace for 15 minutes. All but 0,01 % of the metal volatilized The residue in the boat was very evidently not zinc but some impurity of the metal.

3. A 3 mg. sample of the same zinc was weighed into a boat and about the same weight of purest copper was added. After heating a loss of weight corresponding to 99,99 % of the weight of the zinc was found.

4. Experiments with a commercial alloy containing copper, zinc and a trace of lead gave the following results (1150° C.):

Weight of the sample: mg.	Time of heating:	Loss in weight: mg.	Loss in weight: %
1,252	15′	0,458	36,6
1,320	15′	0,487	36,9
1,639	15′	0,622	37,9
1,599	10′	0,608	38,0
1,158	10′	0,436	37,7
1,172	10′	0,451	38,4
3,414	10′	1,289	37,7
3,260	10′	1,190	36,5
3,379	10′	1,279	37,9
3,041	10′	1,138	37,4
			37,5% average

Electrolytic determinations of the copper in the same alloy gave the following results: 63,03%, 62,94% and 62,88% or 62,95% copper in average. Therefore not more than 37,05% volatile constituents (zinc and lead) should be found in the alloy.

5. Experiments with brass (10 minutes at 1150° C.) gave the following results:

Weight of somple: mg.	Loss in weight: mg.	Loss in weight: %
2,777	1,096	39,6
3,290	1,287	39,1
3,015	1,205	40,0
2,690	1,064	39,6
3,223	1,246	38,6
3,174	1,223	38,5
3,130	1,228	39,2
		39,2% average.

According to the average from eight macro analyses the composition of the brass was as follows: 61,67% Cu, 2,85% Pb, 35,64% Zn and 0,01% Fe and Al, indicating a total of 38,5% volatile constituents (Zn, Pb and Fe).

6. In a great number of experiments it was tried to volatilize the zinc at lower temperatures. It is not surprising that in the average lower results for the volatile constituents were obtained, which agreed better with the results of analyses carried out with

the usual methods. But the results of a series of distillation experiments were more inconsistent and the influence of the sample and the time of heating became very pronounced. One has to take in consideration that using a temperature above 1083° C. the sample will remain in the liquid state during the entire time of heating, whereas using a temperature lower than the melting point of the copper at least the last parts of the volatile constituents have to be expelled from a solidified bead.

At 1000° C. a 1.5 mg. sample of the copper-zinc alloy mentioned in „4.“ lost 38,4% of its weight in 30 minutes. A 3,4 mg. sample of the same alloy lost in the same time only 30,1% of its weight and 90 minutes heating were necessary in order to volatilize 36,4% of the initial weight. Using a roaring Bunsen flame as source of heat, the procedure required even more time. Depending upon the weight of the sample, heating had to be continued up to two and a half hours in order to obtain constant weight. The use of a single Bunsen burner for heating the sample has a further disadvantage. Due to the fact that only a short section of the tube is heated, the zinc condenses before as well as in the rear of the boat thus involving the danger of contamination on removing the boat.

The results under „4.“ and „5.“ show greater deviations than could be explained by mere weighing errors. Furthermore the results on an average are higher than those obtained by the usual methods. It is expected that an explanation of these facts could be obtained from a continuation of the experiments under slightly varied conditions, which must permit an accurate control of the distillation process. Up to the present the use of complicated apparatus was intentionally avoided.

Summary.

The sum of the volatile constituents of copper-zinc alloys can be rapidly determined on samples of a few milligrams weight by heating at 1150° C. for 10 minutes in a gentle current of hydrogen The apparatus necessary, consisting of a Kipp generator, a gas wash bottle, a short piece of quartz tube and an electric resistance tube furnace, is available in almost every laboratory. In ex-

periments performed the results were on an average about 0,5% (abs.) too high, the maximum deviations between individual determinations being 1,5% (abs.). Reasons indicating that, when dealing with commercial alloys, quantitative separations by fractional volatilization will not permit the obtaining of results of high precision are discussed with reference to the literature on the subject.

USE OF THE PHOTOVOLTAIC CELL IN MICRO ACIDIMETRY.

By

H. M. PARTRIDGE and **RICHARD A. SMITH.**

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College of New York University, New York, N. Y.

(Received April 19, 1932.)

In this communication a precise method of titrating small quantities of strong acids with strong bases will be described. The combined volume of the approximate 0,01 N acid and 0,01 N base is about 7,2 cc.: the total volume is about 8,6 cc. The endpoint can be determined accurately to within a few thousanths of a cubic centimeter, and this endpoint is practically the equivalence point. This means that a quantity of strong acid such as that present in 5 cc. of a 0,007 N solution can be titrated with accuracy. For example, in the experiments to be described 1,715 mg. of sulfuric acid was titrated.

The method consists of means for varying the amount of light which traverses the solution under measurement and a series of filters. The resulting illumination falls on a light sensitive cell and gives rise to a photovoltaic E. M. F. which is always adjusted until it balances a previously selected constant difference of potential. In general, the light filters are so selected that the light which they transmit will lie in the spectral region which approximates a maximum absorption for the indicator when completely converted to its acid or alkaline form.

The Preparation of Chemicals.

0,007 N sulfuric acid was prepared by very carefully diluting exactly 0,1 N acid with the proper quantity of carbon dioxide free water. Samples prepared independently by different chemists were compared and utilized. In the experiments described in this paper, the acid was diluted to approximately 0,007 N. The water used for dilution was prepared by boiling distilled water. It was kept in such a manner as to remain carbon dioxide free.

0,01 N sodium hydroxide was prepared in accordance with the method described by PREGL[1].

„Oily lye“ was prepared by dissolving the purest sodium hydroxide obtainable in an equal weight of water. This was allowed to stand in a rubber stoppered bottle for a long period of time. The carbonate free sodium hydroxide solution so prepared was diluted with the proper amount of carbon dioxide free water to yield an approximate hundreth normal solution (about 0,3 cc. of „oily lye“ to 400 cc. of water).

The indicator used in the experiments to be described was a 1% solution of bromo-thymol-blue (di-bromo-thymol-sulfon-phthalein) in 95% alcohol. The color change from pH 6 to pH 7,4 is from light yellow to deep blue[2].

The photovoltaic cell.

Descriptions of various methods involving the use of a photoelectric cell as an aid in following the course of a titration have appeared in conjunction with titrations on a macro scale[3]. In most cases very feeble photoelectric currents were obtained, and it was necessary to resort to amplification. A single stage of amplification involving an audion (radio) tube was generally employed. Gas filled cells were employed which were satisfactory in that increased sensitivity was obtained, but which were unsatisfactory in so far as stability and electrical leakage were concerned. A cell combining the advantages of the former cells with a minimum of disadvantages would be highly desirable. A dry type of cell[4] which has made its appearance within the last few months seems to have the most favorable characteristics of those available at the present time. It has been used exclusively in the researches reported herein. The output of such a cell is dependent upon the photovoltaic electro motive force developed, and for this reason the cell may be termed a photovoltaic cell to differentiate it from the photoelectric and photoconductive types. The use of such a cell for following the course of macro acid-base titrations with phenolphthalein as an indicator has been described by PARTRIDGE[5]. Its use in a colorimeter for determining the concentration of hemoglobin in blood has been described by SMITH[6].

---

[1] F. PREGL, Ztschr. analyt. Chem., **67**, 23 (1925).

[2] CLARK, „The Determination of Hydrogen Ions“, Williams & Wilkins, Baltimore (1928).

[3] R. H. MÜLLER and H. M. PARTRIDGE, Ind. and Eng. Chem., **20**, 423 (1928); PARTRIDGE, Electronics, **1**, July (1930); PARTRIDGE, Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed., **2**, 207 (1930).

[4] The "Photronic" cell Model No. 594 of the Weston Electrical Instrument Co.

Cell Characteristics.

Inasmuch as the photovoltaic cell used is, commercially, a relatively new device, a few words as to its characteristics will not be amiss. The data published by the manufacturers is not altogether sufficient for experimental research adaptation. Simple experiments with filters showed maximum sensitivity in the yellow green portion of the spectrum with some response in the ultraviolet and near infra-red. The cell is far superior to gas filled photoelectric cells in respect to stability. The resistance of the cell under the conditions of experimental usage is comparable to that of a medium sensitivity portable galvanometer; this makes possible simple, yet sensitive, electrical arrangements.

The electrical characteristics of the cell were studied by varying the distance of the cell from a light source. A six volt, 21 candle power, concentrated filament, nitrogen filled automobile headlinght lamp was so mounted that measured positions with respect to the light source were possible.

Table 1 is a compilation of the data so obtained.

D is the distance in centimeters between the cell and the light source.

E is a millivolt expression of the photovoltaic E. M. F. as measured by the conventional HILDEBRAND potentiometric method.

---

[5] H. M. PARTRIDGE, Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed. (1932) in press.

[6] R. A. SMITH, American Medicine, March, 1932.

R is the resistance of the cell corrected for the resistance of the measuring instruments.

I is the current flow in milliamperes with the cell short circuited; obtained by calculation.

Table 1.

D cm.	E Millivolts	I max. Calcd. Microamperes	W max. Calcd. Milli-Microwatts	R cell Ohms
10	98,7	100,4	9910	983
20	45,7	20,7	946	2221
30	27,3	9,38	256	2910
40	17,7	5,05	89,4	3400
50	12,4	3,28	40,6	3780
60	9,2	2,31	21,2	3980
70	7,3	1,77	12,9	4130
80	6,0	1,41	8,47	4250
100	4,2	0,97	4,08	4310

Figure 1 will serve to illustrate graphically the relationships between the E. M. F., current, and power respectively with inten-

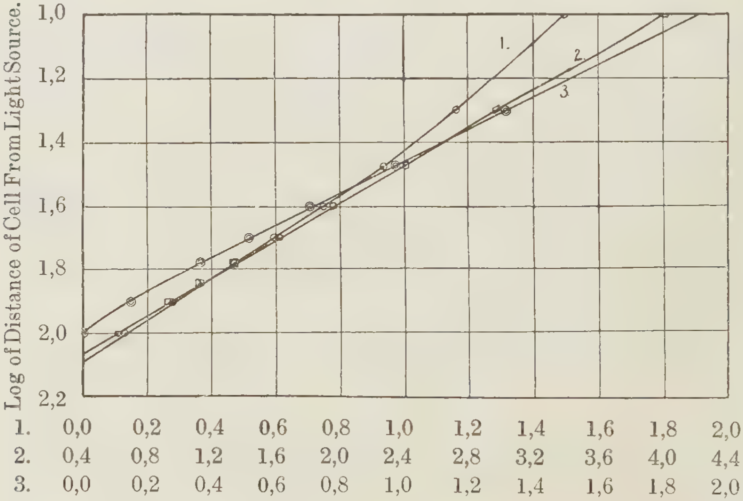


Figure 1. Electrical Characteristics of the Cell With Varying Light Intensity.
Curve 1. Log of E. M. F. in Millivolts Against Log of Distance in Centimeters.
Curve 2. Log of Power in Millimicrowatts Against Log of Distance in Centimeters.
Curve 3. Log of Current in Microamperes Against Log of Distance in Centimeters.

sity of light. The logarithmic values are plotted. At distance values corresponding to light intensities of relatively low magnitude the slopes of the curves are constant. Under such conditions it is valid to assume the applicability of the inverse square law; therefore, the values given in the second column of Table 2 may be considered approximately correct.

Table 2.

Relations obtained from Figure 1.

$E = K_1 D^{1,55}$ $E = K_4 C^{0,775}$
$I = K_2 D^{1,85}$ $I = K_5 C^{0,925}$
$W = K_3 D^{3,39}$ $W = K_6 C^{1,70}$
$C =$ light intensity.

A consideration of the values indicated in Figure 1 will allow us to deduce which characteristic is the most suitable for measurement in the method to be described. The necessary use of light filters reduces the light intensity from one to ten percent of the original value in a narrow spectral band; exceedingly delicate measuring instruments would be needed to measure the feeble currents which would be obtained. However, the E. M. F. characteristic. makes possible the use of a so-called "null" method of measurement. This consists of balancing the E. M. F. developed by the cell against a known potential by means of suitable variable resistances and a galvanometer. The electrical arrangement is familiar. As no absolute current readings are to be taken, the galvanometer may be of a relatively rugged type. The apparatus to be described simplifies matters still more by eliminating the use of a known balancing potential. The instrument is balanced by means of a simple potentiometer arrangement just once for a series of determinations. Values of E. M. F. of the cell are not read, but rather, the intensity of the light source is varied so that the E. M. F. of the cell is always constant. This is very easily accomplished by manipulating an iris diaphragm between the cell and the light source. Differences in absorption of material placed before the cell can be measured as a function of diaphragm apertures (Figure 6). The electrical characteristics are constant at all balanced positions of the apparatus, thereby eliminating many

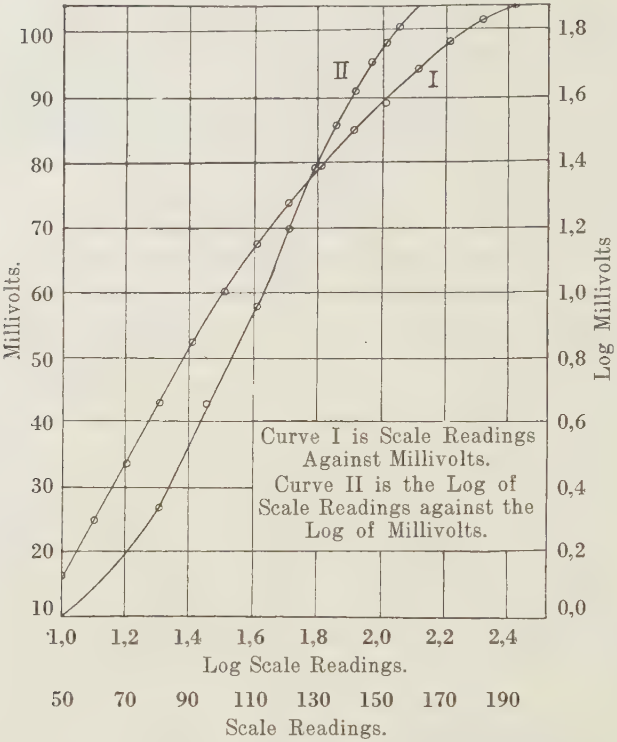


Figure 6. Variation of E. M. F. Cell With Illumination.

possibilities of error present in most previous methods. The only manipulation of the instrument is the opening and closing of the iris diaphragm. The method is convenient, reasonably rapid, and flexible. It is particularly well adapted to measurements of change such as are encountered in the colorimetric titration of 0,01 N acids and bases. By references to standards, actual pH values can be estimated.

Light filters.

A curve representing changes of indicator color against additions of alkali is analagous to an acidimetry curve of change of pH against alkali. The color changes of the indicator under experimental conditions are a measure of hydrogen ion concentration. This curve, to be of practical use in colorimetric titrometry, should be of such a nature that there is a definite point of inflection such that the element of the curve through the point of inflection is sensibly parallel to the axis representing change of pH. This point of inflection corresponds to the stoichemitric end point. It is related to the region of greatest color change of the indicator in that the greater the magnitude of color change upon the addition of alkali, the more definite will be the point of inflection. The more definite the point of inflection, the greater will be the accuracy of the titration. For this reason it is desirable to observe only that absorption band of the indicator which undergoes the greatest change. The most convenient portion of the spectrum to use for study can be determined by simple experiments with a pocket spectroscope. Once this absorption zone is decided upon, a combination of light filters is selected which transmit only that zone. Here again, the spectroscope will prove very helpful. The authors have found combinations of Wratten and Corning filters suitable for all conditions so far encountered.

Choice of indicator.

The choice of a suitable indicator in a titration of a strong acid with a strong base, both of one hundreth normality, where the course of neutralization is to be determined with a light sensitive cell is not a simple matter. In nearly all types of strong acid and strong base neutralization, especially in very dilute solutions, there is an error due to the excess reagent which must be added to give a color change to the indicator. This error depends upon the character of the indicator and upon the dilution. In the case of titrations of 0,1 N reagents, the change of hydrogen ion concentration near the equivalence point is very sudden; the transition from feeble acid to feeble alkaline reaction passes rapidly from pH3 to pH11. Such is not the case with the less concentrated 0,01 N reagents, and it is necessary to chose an indicator which suffers its greatest measurable color change in the range where there is a rapid pH change. This occurs in the vicinity of pH7. For example, indicators (such as neutral red, phenol red, rosolic acid, brom-thymol-blue, etc.) which have a color interval in this range do not require any excess of acid or alkali to undergo a perceptible color change on neutralization with hundreth normal reagents[7]. Methyl yellow requires an excess of 0,8 cc. of acid per 100 cc. of solution to give a perceptible color change; phenolphthalein requires an excess of 0,2 cc. of base under similar conditions. This point limits the selection of indicators. It is essential that the color change be as rapid as possible because, as is pointed out in the discussion of light filters, we are really concerned with a measurement of change of pH (as measured by indicator color change) against additions of alkali. To interpret a curve representing these changes in such a manner as to obtain an end point, it is essential that there be a flex or decided change in curvature at some one well defined point. This is similar to requirements in potentiometric titrations. This point can be estimated with the greatest accuracy when the pH change is rapid and where the indicator accurately translates this change to the observer. The usefulness of a given indicator for the present method is determined by the intensity of the light source, the monochromaticity of the light, and by the characteristics of the indicator, itself. The authors found bromo-thymol-blue with a transition range of about pH 6 to pH 7,4 satisfactory; the indicator exponent of 6,8 is generally accepted. It is interesting to note that if we select this indicator, the titration error, or error resulting because the indicator does not change exactly at the equivalence point, is of very small magnitude. The error depends on the sensitivity of the indicator, temperature, dilution, etc. It can be calculated as fellows:

$$\text{Titration Error} = \frac{-10^{-6,8} \times 10 \times 100 =}{5 \times 0,01} - 0,003 \text{ percent}$$

(Assuming 5 cc. of 0.01 N alkali added, total volume being 10 cc.)

This would mean that the indicator changes 0,0003 cc. too soon; an amount far outside the limits of experimental error. The calculations are not strictly true as in later interpretation of results, it will be noticed that the end-point is taken as the point where the indicator ceases a rapid color change upon addition of alkali. The titration error is probably positive in sign and of a slightly greater magnitude than that estimated above.

---

[7] KOLTHOFF and FURMANN, "Indicators". John Wiley & Sons, N. Y., Page 106 (1926).

Description of apparatus.

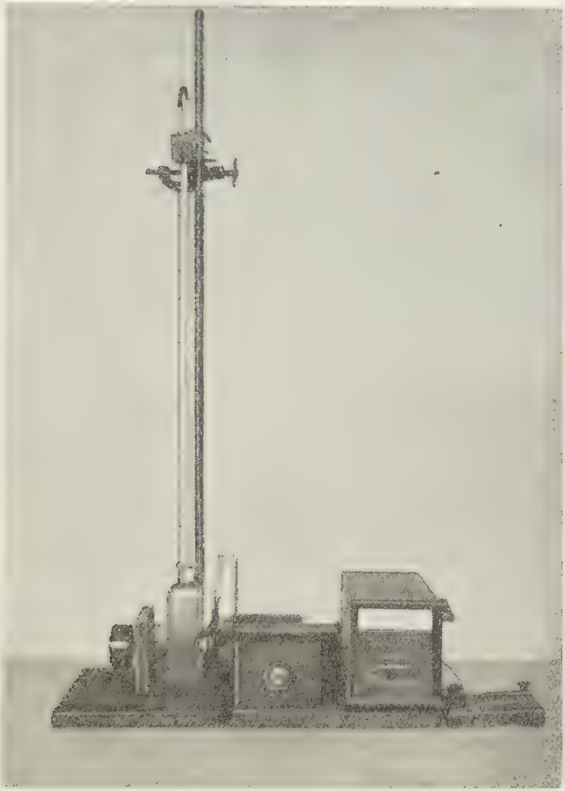


Figure 2.
Assembly of Apparatus.

The buret used in the experiments is a modification of the type designed by BENEDETTI-PICHLER[8].

It is of 5 cc. capacity; readings taken were accurate to ± 0,001 cc. The complete apparatus is shown in the photograph in Figure 2. This photograph was taken during the development of the apparatus and the absorption cell depicted was not used in the experiments herein described. A smaller one of 15 cc. total capacity was found to be more suitable. Figure 3 is a diagramatic

---

[8] A. BENEDETTI-PICHLER, Ztschr. analyt. Chem., 73, 200 (1928).

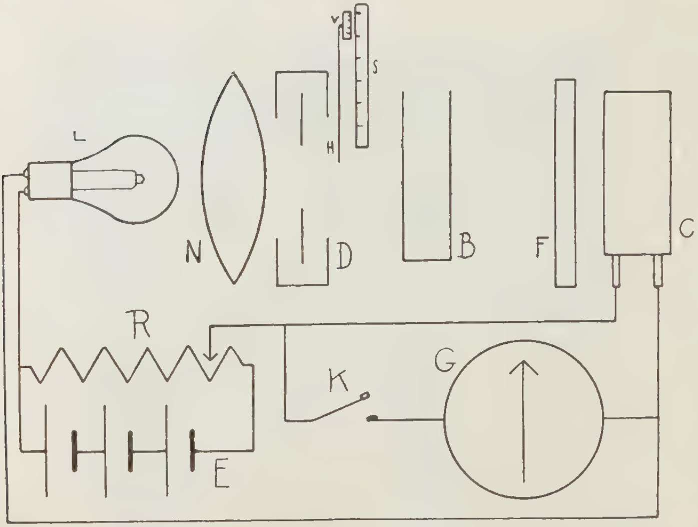


Figure 3.
Diagram of Photo-Voltaic Titration Apparatus.

representation of the apparatus. The light source (L) is a 64 candle power automobile headlight lamp of the double filament type lighted by (E) a six volt storage battery. It is essential that the potential of the storage battery remain constant throughout a series of determinations in order that the light source remain constant. A storage battery of a high ampere hour capacity will suffice. The authors have successfully used a small 100 ampere hour radio battery which was kept at a 5 ampere charge while the lamp consumed 7,5 amperes. (N) is a short focus condensing lens focused so as to transmit the greatest possible amount of light to the area controlled by the iris diaphragm (D). The diaphragm used to control the light intensity has an extension arm (H) fastened to its controlling lever so that all positions of the diaphragm may be read upon a 200 mm. scale (S). A vernier (V) fastened to the end of the extension arm allows readings with a precision of 1 part in 2000. The container or absorption cell (B) in which the actual titration takes place consists of a 15 cc. square bottle relatively free from optical defects. (F) is the light filter. The different combinations of filters which were used will be indicated in the data. (C) is the photovoltaic cell which has already been described. (G) is the galvanometer which indicates when the opposing potentials are equal. A portable lamp and scale type with a sensitivity of about 150 mm. per microampere was used. (K) is the tapping key which serves to keep the galvanometer disconnected except when it is desirable to observe electrical balance. (R) is a variable resistance shunted across the storage battery which supplies current for the illumination; it is a combination of a 20,000 ohm tapped, fixed resistance and a 2,000 ohm variable resistance. This combination serves as a means of obtaining the potential to oppose that developed by the photovoltaic cell. The electrical circuit is depicted in Figure 4.

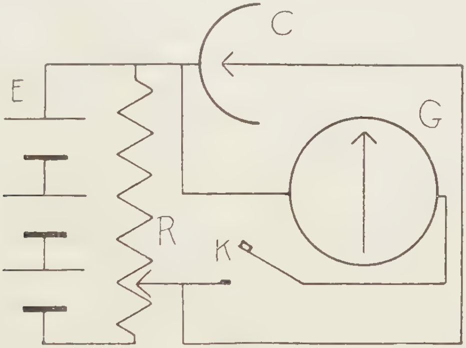


Figure 4.
Electrical Circuit.

Procedure.

A five cc. sample of approximately 0,007 N sulfuric acid was carefully pipetted into the absorption cell in which the titration was to take place. A pipet calibrated by the U. S. Bureau of Standards was used for this transfer. Two drops of 1% Brom Thymol Blue were then added and the cell placed in the apparatus. The iris diaphragm was set to indicate a scale reading of about 25 and the potential developed by the cell at that illumination was balanced electrically by means of the variable resistance. Additions of 0,01 N sodium hydroxide from the buret were then begun. The apparatus was balanced for each addition of alkali. It is necessary to stir the solution thoroughly after each addition of base, this can best be done by means of a rapid stream of an inert gas. The only important settings of the iris diaphragm lie in the vicinity of the equivalence point. Diaphragm readings are then plotted against buret reading; in the resulting curve the buret reading corresponding to the point of inflection on the curve indicates the equivalence point. This volume is corrected for the initial buret reading to ascertain the actual amount of alkali needed for the neutralization.

It should be noted that the "drop error" common to all visual types of titration is eliminated.

Results.

Fig. 5 illustrates the change in scale readings for additions of alkali in five titrations. Different filters were used in each case.

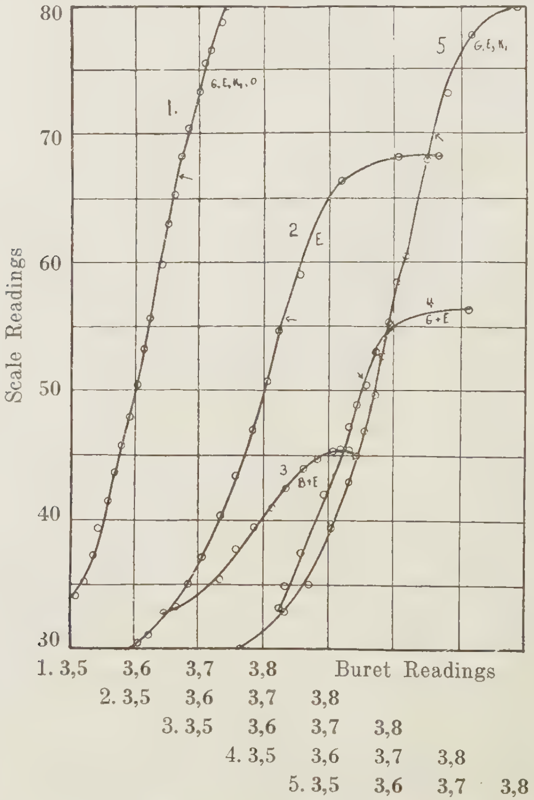


Figure 5. Indicator Change With Alkali, With Various Light Filters.

Table 3.

Curve No.	Filters*	End Point on Curve	Corrected End Point
1	G, E, K_1, O	3,665	3,656
2	E	3,705	3,669
3	B, E	3,623	—
4	G, E	3,656	3,662
5	G, E, K_1	3,660	3,656

The curves illustrate the effect of monochromaticity and intensity of illumination upon sensitivity. Table 3 shows the filters used for each titration, the observed endpoints, and the corrected volumes of alkali needed for neutralization. It will be noticed that even with the different combinations of filters, the checks are very satisfactory. Table 4 illustrates the data from which curves 1, 2, 4, and 5 were plotted.

Table 4.

Curve 1		Curve 2	
Buret Reading	Scale Readings	Buret Readings	Scale Readings
0,009		0,036	
3,411	25,5	3,257	27,0
3,480	30,6	3,332	27,4
3,483	31,4	3,392	27,5
3,498	33,0	3,472	29,0
3,508	34,0	3,505	30,4
3,521	35,1	3,520**	31,0**
3,537	37,2	3,547	32,7
3,542**	39,3**	3,561	33,5
3,556	41,4	3,584	35,0
3,566	43,6	3,604	37,1
3,579	45,7	3,632	40,1
3,596	48,0	3,655	43,5
3,601	50,5	3,682	47,0

---

* The symbols for light filters have the following significance:

B, G, E, and K_1 are Wratten filters Series M of the same letter designation. 0 is the Noviol 0,2.55 mm. thick, of the Corning glass Co.

** Indicates visual end point.

Curve 1

Buret Reading	Scale Readings
3,611	53,3
3,622	55,6
3,640	59,8
3,650	63,0
3,661	65,2
3,670	68,3
3,682	70,5
3,698	73,3
3,708	75,5
3,716	76,6
3,732	78,8
3,742	80,0
3,757	81,6
3,768	82,0
3,778	82,6
3,788	83,4
3,801	83,6
3,822	83,9
3,842	83,9
3,870	83,9
3,963	83,9

Curve 2

Bnret Readings	Scale Readings
3,703	50,8
3,721	54,8
3,755	59,1
3,78,1	61,9
3,819	66,3
3,902	68,5
3,969	68,5

Curve 4

Buret Reading	Scale Readings
1—0,006	
3,243	25,3
3,255	25,3
3,367	26,5
3,371	26,8
3,420*	28,3*
3,523	33,3
3,535	34,9
3,560	37,5
3,593	42,0

Curve 5

Buret Readings	Scale Readings
0,004	
3,260	28,4
3,3,7	28,7
3,332	29,5
3,363	30,0
3,410	32,2
3,422	32,6
3,432*	33,5*
3,471	35,1
3,504	39,5

---

* Indicates visual end point.

Curve 4		Curve 5	
Buret Reading	Scale Readings	Buret Readings	Scale Readings
3,619	45,6	3,531	42,9
3,631	47,3	3,542	45,0
3,462	49,0	3,553	46,9
3,656	50,5	3,570	49,8
3,672	53,2	3,580	52,8
3,691	55,5	3,591	55,4
3,708	55,0	3,602	58,6
3,817	56,6	3,618	60,6
		3,629	63,0
		3,650	68,1
		3,682	73,3
		3,720	77,7
		3,791	80,0
		3,898	80,5

The average deviation of a single result is a little less than 0,005 cc. The error is about 1 part in 750.

Summary.

A method of acidimitry of strong acids and strong bases has been described which employs a light sensitive cell for following indicator color changes. 5 cc. of 0,007 N acid can be titrated to the equivalence point with an error of 1 part in 750.

MICRO ACIDIMETRY OF NITROPHENOLS WITH THE GLASS ELECTRODE.

By

H. M. PARTRIDGE and **J. A. C. BOWLES.**

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University, New York, N. Y.

(Received April 19, 1932.)

The colorimetric estimation of substances of the nitro phenol type on a macro scale has been reported by several investigators[1]. The first of these uses a smooth platinum electrode in the presence of an inert gas to avoid trouble from oxidation and is an acidimetric method. The remaining two are oxidimetric methods. All would seem to be effected with greater difficulty than the method to be described.

The present method is based upon the dissociation of the nitrophenols as acids and their titration with standard alkali using the glass electrode as the hydrogen ion indicator which is unaffected by oxidation potentials. The potential measurements are made by the POGGENDORF method using a vacuum tube galvanometer as the null instrument.

Electrodes.

The following electrode combination was used for the titration cell.

Ag, AgCl, Buffer, Glass // Solution, Buffer, AgCl, Ag.

The electrode silver was chemically pure silver wire cleaned by rubbing with fine carborundum cloth, dipped in nitric acid and washed several times with boiling distilled water.

---

[1] W. D. TREADWELL and G. SCHWARZENBACH, Helv. Chim. Acta, **11**, 386 (1928).

T. CALLAN and S. HORROBIN, J. Soc. Chem. Ind., **47**, 334 (1928).

J. M. KOLTHOFF and C. ROBINSON, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, **45**, 169 (1926).

The silver chloride was precipitated from approximately 0,001 N silver nitrate solution slowly added to hydrochloric acid solution about one tenth as concentrated. The resulting precipitate was washed several times by decantation, allowed to stand for several weeks in distilled water, washed again and then placed in CLARK and LUBS buffers[2] of pH 2,0, 4,0 and 6,0 respectively. These buffers, saturated with AgCl were stored in paraffined bottles away from light for at least one month before using.

The glass electrodes were of the conventional HABER type blown from Corning Glass Works 015 soft glass. They varied in diameter from 1,0 cm. to 1,4 cm. and resistance from 3,2 megohms to 7,0 megohms.

The reference electrode was of the general type described by Ball[3].

It was prepared by sealing a carefully washed asbestos fiber of about 5 mm. length into the constricted tip of a piece of glass tubing. The electrode materials in each case were the same as those contained in the glass electrode.

A system having the chain previously mentioned where the "solution" was a buffer of pH 2 and the "buffers" were also of this value gave an E. M. F. of 24,0 millivolts at 21,6° C. This value included, of course, the various contact, asymmetry and junction potentials. The glass electrode was, in this case positive.

Method of E. M. F. Measurement.

Because of the low potentials developed in the cells to be measured and their comparatively high resistance, the conventional POGGENDOF method was used with a vacuum tube galvanometer, similar to that described by one of the authors in a previous paper[4].

Figure 1 shows the electrical connection.

---

[2] See CLARK, The Determination of Hydrogen Ions, WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, Maryland.

[3] BALL, Ind. Eng. Chem., 19, 370 (1927).

[4] H. M. PARTRIDGE, Mikrochemie, **XI**, 337 (1932).

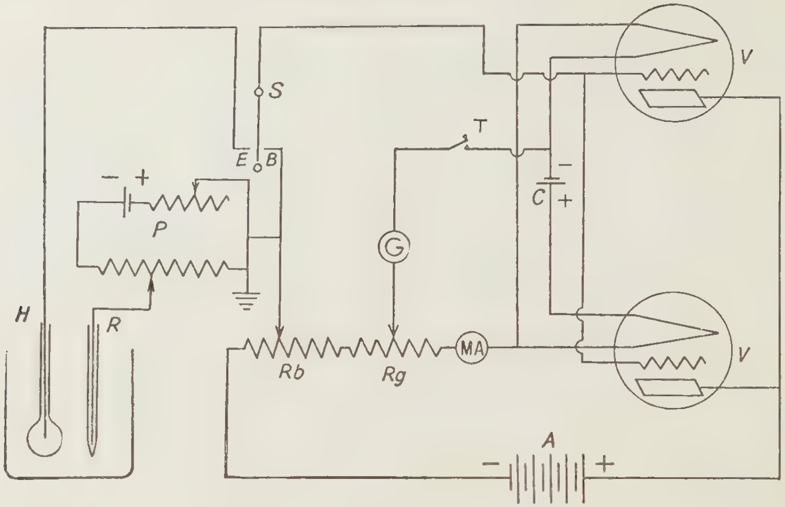


Figure 1.
Electrical Connections for E. M. F. Measurements.

The following is a list of the circuit constants.

H. — Haber type glass electrode; resistance 3,2—7,0 megohms.
R. — Silver chloride reference half cell (see "Electrodes").
P. — Conventional method of securing known potential.
S. — High leakage resistance low capacity grid switch.
Rb. — Bias resistor 1500 ohms.
Rg. — Free grid adjusting resistor 3000 ohms.
G. — Portable pointer type galvanometer; resistance 1100 ohms; sensitivity 8 mm. per μa.
M. A. — 1 milliampere meter.
T. — Tapping switch.
A. — Anode battery; 12 large size flashlight cells; approximately 18 volts.
C. — Cathode battery; 100 ampere hour 2 volt storage cell.
V, V, — Duovace UX 264 radio valves (kindly furnished by Dr. E. R. Wagner of the Duovac Radio Tube Corp. of Brooklyn, N. Y.).

Figure 2 gives a general idea of the assembly of apparatus. It will be noted that, in this figure, C represents a three cell battery. Only one cell is used at a time. The cathode current is

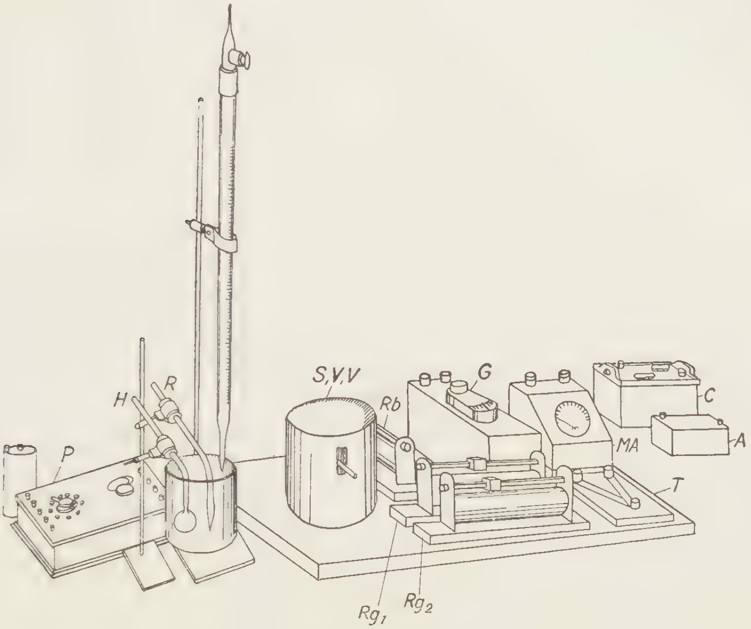


Figure 2.
Assembly of Apparatus.

approximately one quarter ampere. Rg$_2$ is a 100 ohm to 500 ohm "vernier" resistance which, together with Rg$_1$, gives the 3000 ohm resistance Rg of figure 1.

Operation.

With batteries A and C connected as shown, and switch S at position 0, M.A. should read approximately 0,4 milliamperes. After about twenty minutes, (to allow the various parts to come to thermal and chemical equilibrium) Rg is adjusted until no deflection is given by G when T is pressed. (To facilitate this operation, switch S and valves V, V have been enclosed in an electrostatic shield connected to earth as indicated in Figure 2. This is advisable because, during this adjustment, the grids of the valves are at open circuit and will be disturbed by any electrostatic strays such as the rubbing of clothing, sparking electrical equipment, and the like.) Switch S is now placed at B and Rb is adjusted until G again gives no deflection when T is closed. The grids of valves V, V are now at the same closed circuit potential as they formerly were at open circuit and the conditions for minimum current (actually, less than 10^{-10} amperes) flow have been established. Switch S may now be placed at position E and the potential of the titration cell is measured in the conventional way. G replaces the galvanometer in the usual circuit as a null point indicator and the cell potential is read on P. Under actual working conditions, with the constants enumerated above, a sensitivity of 1500 millimeters per volt is obtained. Portable lamp and scale galvanometers can be obtained with approximately twenty times the sensitivity of the one used and with roughly the same moving coil resistance. On such a galvanometer full scale deflection (30 mm.) would be obtained with an off balance potential of one millivolt.

With a freshly charged storage battery, after the initial equilibrium-obtaining period, the apparatus gave a drift of two to five millivolts per hour.

Nitro Phenol Titrations.

As indicated in the introduction, the determinations outlined herewith depend upon the dissociation of the nitro phenols as acids. It is well known that the nitro phenols cannot easily be prepared with a high degree of purity and the necessity for knowing the concentration of such a solution in terms of its p nitro phenol acid content caused this phenol to be selected for a preliminary determination. The first experiment conducted on a macro scale indicated that the method was entirely feasible and could be effected with a fair degree of accuracy.

The phenol as prepared by the Eastman Kodak laboratories was dried overnight in a vacuum desiccator and a solution was made up containing 1,8 milligrams of the dried sample per cc. of solution. The titration cell consisted of a 30 cc. beaker of a diameter just large enough to conveniently hold the glass electrode and the silver chloride half cell. The alkali used was 0,01358 N NaOH prepared by carefully diluting a more concentrated solution with CO_2 free distilled water. The concentrated alkali had been standardized against a solution of HCl carefully prepared from the constant boiling mixture.

Three preliminary experiments made on the undried sample gave excellent checks but seemed to indicate that the sample was rather impure. Table I indicates the results of determinations on the dried sample.

Table I.

Titration of p-Nitro Phenol.

1.

Burette	E	Burette	E
0,010	0,1823	4,75	0,4175
0,550	0,2670	4,775	0,4190
1,020	0,2870	4,805	0,4262
2,110	0,3163	4,840	0,4290
2,500	0,3255	4,875	0,4333
3,050	0,3300	4,900	0,4390
3,575	0,3565	4,925	0,4457
4,070	0,3685	4,950	0,4534
4,100	0,3698	4,995	0,4585
4,250	0,3771	5,025	0,4628
4,375	0,3895	5,050	0,4695
4,500	0,3928	5,090	0,4745
4,525	0,3947	5,125	0,4779
4,550	0,3985	5,150	0,4824
4,585	0,4000	5,180	0,4852
4,625	0,4026	5,220	0,4865
4,650	0,4054	5,420	0,5060
4,680	0,4092	6,045	0,5337
4,720	0,4129		

2.

Burette	E	Burette	E
0,025	0,1611	4,820	0,4083
1,050	0,2858	4,850	0,4120
2,035	0,3128	4,880	0,4158
3,050	0,3350	4,915	0,4198
4,015	0,3640	4,935	0,4236
4,075	0,3660	4,970	0,4286
4,175	0,3701	5,000	0,4327
4,300	0,3757	5,030	0,4382

Burette	E	Burette	E
4,370	0,3782	5,070	0,4438
4,430	0,3812	5,100	0,4489
4,525	0,3866	5,135	0,4513
4,595	0,3904	5,200	0,4669
4,625	0,3931	5,240	0,4713
4,650	0,3949	5,275	0,4748
4,690	0,3972	5,335	0,4821
4,725	0,4003	5,475	0,4961
4,750	0,4029	5,635	0,5072
4,780	0,4051	6,005	0,5273

3.

Burette	E	Burette	E
0,025	—	4,950	0,4576
1,050	0,2873	4,980	0,4610
2,040	0,3120	5,015	0,4658
3,025	0,3338	5,050	0,4678
4,005	0,3620	5,075	0,4708
4,530	0,3914	5,115	0,4748
4,700	0,4094	5,150	0,4765
4,730	0,4139	5,180	0,4800
4,800	0,4255	5,220	0,4828
4,830	0,4321	5,320	0,4939
4,865	0,4375	5,620	0,5136
4,895	0,4445	6,025	0,5317
4,925	0,4513		

The samples in each case represent 5 cc. containing a total of 9 milligrams of the phenol. Figure 3 shows graphically the type of curve obtained which is characteristic for a weak acid. (The ionization constant for p-nitro-phenol is 7×10^{-8}.)

From the data, maximum values of E per cc. of alkali added when corrected for the initial burette reading gave the following results:

Titration	End Point (cc.)	Percent
1	4,870	102,29
2	4,900	102,93
3	4,912	103,17

Average 102,80% ; probable error 0,19%.

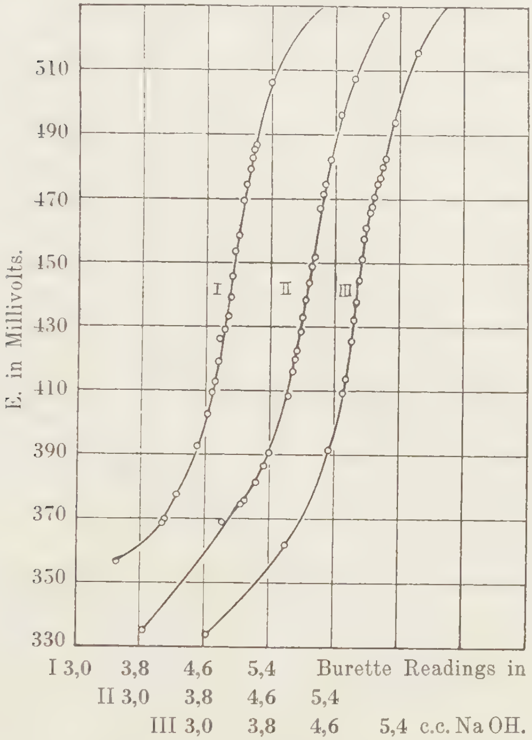


Figure 3.
Potentiometric Titration of Nitro Phenol.

Picric acid (ionization constant $= 2,3 \times 10^{-1}$) was subjected to similar procedure. The sample was from Merck's USP quality vacuum dried and carefully powdered. 5 cc. samples of approximately 0,00785 M solution, equivalent to 9 milligrams, gave the data shown in Table 2 and the curves shown in Figure 4. It will be noted that the latter are characteristic of fairly strong acids.

The results of these titrations, obtained as in the case of p-nitro-phenol are summarized below.

Titration	End Point (cc.)	Percent
1	2,837	98,08
2	2,857	98,77
3	2,860	98,88

Average 98,58 % ; probable error 0,19 %.

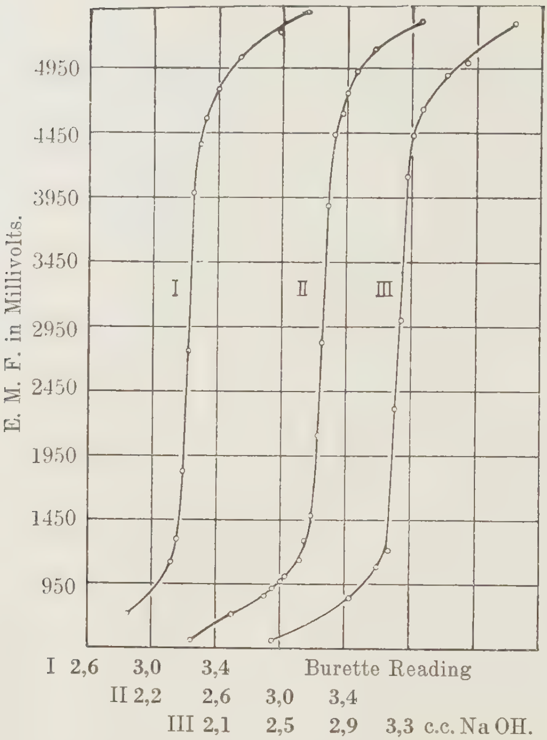


Figure 4.
Potentiometric Titration of Picric Acid.

Table II.

Titration of Picric Acid.

1.

Burette	E	Burette	E
0,010	0,0437	2,790	0,1493
0,550	0,0353	2,825	0,2111
1,015	0,0403	2,855	0,2828
1,475	0,0476	2,885	0,3886
2,050	0,0613	2,925	0,4433
2,300	0,0719	2,970	0,4593
2,500	0,0854	3,000	0,4750
2,550	0,0919	3,060	0,4921
2,600	0,0967	3,170	0,5105

Burette	E	Burette	E
2,625	0,1010	3,450	0,5315
2,720	0,1141	3,915	0,5478
2,750	0,1285		

2.

Burette	E	Burette	E
0,000	—	2,84	0,3100
1,025	0,0334	2,875	0,4117
2,050	0,0522	2,91	0,4430
2,535	0,0837	2,97	0,4629
2,700	0,1088	3,015	0,4893
2,73	0,1213	3,24	0,5090
2,775	0,1487	3,525	0,5297
2,805	0,2312		

3.

Burette	E	Burette	E
0,000	—	2,850	0,3984
1,515	0,0376	2,895	0,4360
2,450	0,722	2,925	0,4563
2,720	0,1126	3,000	0,4790
2,750	0,1300	3,130	0,5035
2,790	0,1828	3,380	0,5231
2,825	0,2758	3,455	0,5390

Discussion of Results.

The E. M. F. values in all cases are 1,066 times the true values. Since only changes in potential are wanted, the readings were not corrected. Volumes of standard reagent were read on a 10 cc. micro burette of the type devised by Benedetti-Pichler[5] which could be estimated to 0,005 cc. The constants for the two sets of titrations are summarized below.

Substance	Ionization Constant	Vol. Sample cc.	Strength of Sol	Weight of Sample Milligram	Vol. of Std. Solution cc.	Probable Error Parts per Thousand
p-nitro-phenol	7×10^{-8}	5000	0,0129 M	9	4,894	1,96
Picric Acid	$2{,}3 \times 10^{-1}$	5000	0,00785M	9	2,851	1,96

---

[5] A. Benedetti-Pichler, Ztschr. analyt. Chem., **73**, 200 (1928).

It will be noted from the p-nitro-phenol data that values of over 100 percent were obtained on the basis of the weight of the sample. This means of course, that some acid impurity of lower molecular weight was present in the sample. Nitrogen determinations on this product gave a value slightly in excess of the theoretical and the melting point of the material was 2,7° below that for the pure substance. The error cannot be attributed to the fact that a dilute solution of a weak acid was being titrated since this error would be negligible[6].

For the picric acid, the deviation from the theoretical was also in line with the melting point values.

Further determinations on some "pure" picric acid gave an average value of 99,2%. The para-nitro-phenol used in the above work was treated with bone black and twice recrystallized from warm water. This material gave an average value of 101,7%. Since the principles of the method remain the same for these products, the data and graphs are not included.

An idea of the rapidity of the method may be gained from the fact that approximately one minute is required for each pair of readings.

Summary.

A comparatively rapid and precise potentiometric method for the micro determination of the nitro phenols with greater acid ionization constants than 10^{-8} has been given. The method employs the glass electrode as the indicator of hydrogen ion activity and a vacuum tube galvanometer for the null instrument.

---

[6] Roller, Journ. Amer. chem. Soc., **50**, 1 (1928).

A ZERO CURRENT VACUUM TUBE GALVANOMETER.

By

H. M. PARTRIDGE[1].

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College of New York University, New York, N. Y.

(Received April 19, 1932.)

For micro potentiometric determinations which usually involve cells with small electrodes and high internal resistance, it is necessary to employ measuring devices which require very small currents in order that accurate values for the E. M. F. may be obtained. Very often, also, as little as 10^{-6} amperes may cause polarization of the electrodes and give results which do not reflect the true equilibrium conditions. In the case of glass electrode mesurements where a resistance of 10^7 to 10^8 ohms is common, a simple application of Ohm's Law will show that currents larger than 10^{-11} to 10^{-12} amperes will cause appreciable errors neglecting any tendency toward polarization caused by unwanted current.

In addition to the low current requirement, the possibility of using a rugged short period galvanometer of the portable type for indicating the amplified current has obvious advantages. The following description includes a method which has been developed with these demands in mind.

In another paper[2] the author described a vacuum tube potentiometer which, although very useful for many purposes, had limitations when used by those not generally familiar with vacuum tube circuits. At that time, unfortunately, in the light of what we now know, no really good tubes were available and many of the improvements embodied in this paper had to await their development.

---

[1] From a paper read by title in the Division of Physical and Inorganic Chemistry at the General Meeting of the American Chemical Society. Cincinnati, Ohio, September 10, 1930.

[2] Journ. Amer. Chem. Soc., **51**, 1 (1929).

Ultimate perfection has not yet been attained but the many requests for further information pursuant to brief descriptions already given[3] and the satisfaction which the present device has given in photoelectric cell and glass electrode measurements have furnished the incentive for the present paper. With a photoelectric colorimeter, for example, as little as 10^{-7} moles per liter of neodymium ion has been measured using an absorption cell of 13 mm. thickness[4].

Before describing the device, let us consider some of its attributes and the reasons for their being developed:

1. Sensitivity.
   With a portable pointer type galvanometer, 750—1500 millimeters per volt are obtained.
2. Simplicity and speed of operation.
3. Minimum current drain from cell being measured.
   Always desirable and necessary in high resistance circuits where the product of current and resistance will cause significant errors.
4. Independence from varying tube characteristics with time.
5. Minimum number of tubes and batteries.
   Results in fewer variables.
6. Minimum number of movable contacts required to carry current. Includes switches and variable resistances which are a great source of trouble due to surface contamination, especially in a chemical laboratory.
7. Use of rugged, portable null registering instrument.
8. Self-contained shielding.
   Attainable only to a certain limit and impossible where electrical strays may induce currents of a magnitude comparable

---

[3a] Abstracts, Cincinnati Meeting, loc. cit.

[3b] J. M. KOLTHOFF and FURMAN, Potentiometric Titrations, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1931.

[4] C. J. RODDEN with H. M. PARTRIDGE, Abstracts 81st Meeting, A. C. S., Indianapolis, Ind., April 1, 1931.

with currents flowing in the circuit being measured (10^{-10} amperes and less).

9. Freedom from drift with time.
10. Minimum current drain from tube power supply. Assures steadiness of operation.
11. Flexibility.

Choice of Circuit.

With the above specifications in mind, several circuits described in other papers were reviewed. A bibliography of these appears in a previous paper[5] and need not be repeated here.

For convenience, these may be partially classified as follows:

1. Direct reading (one or more tubes in cascade).
   a) Indicating instrument in output plate circuit.
2. Grid circuit compensating.
   a) Standard deflection of output plate meter.
   b) Plate-filament resistance forming one arm of bridge.
   c) Plate-filament resistances of two tubes in bridge circuit.
   d) I R drop in plate resistor balanced by externally applied potential.

Type 1 depends on empirical calibration and also on the constancy of tube characteristics and of potential supplies. These are difficult, if not impossible, to realize where precision measurements are required.

Type 2 requires constancy of tube characteristics and apparatus only for the duration of a single measurement, an obvious advantage.

2 a, requires the plate meter to continually pass the plate current which is taken as the reference value. Sensitivity depends on the change in this value with unit change of applied grid potential.

Cases b, c and d, have the advantage of allowing a null instrument (galvanometer) to be used as indicator but, as usually employed, require extra batteries (b and d) or an extra tube (c), which mean, in practice, extra variables.

---

[5] Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 2, 207 (1930).

Type 2 b, was considered to offer the best possibilities. A schematic circuit as usually employed is shown in Figure 1.

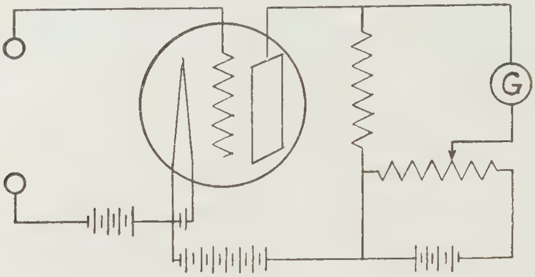


Figure 1.
Common Method of Balancing
Plate Current.

Tube Characteriestics.

Having decided upon the general type of circuit arrangement, attention was directed to the characteristics of three general types of tube: triodes, tetrodes, pentodes. In the first class commercial types —99, —20, —01 A, —12 A, —71 A, —30 and —31 were considered. The second included —22, —24 and —32. In addition, approximately twenty special types including pentodes were kindly furnished by three well-known manufacturers.

Among the desirable (though not always attainable) tube qualities, the following are important:

a) Low filament current.
b) Low plate current.
c) Low plate-filament impedance.
d) High grid-filament impedance.
e) Low gas content.
f) Low filament temperature.
g) High mutual conductance at low plate potentials.
h) Low grid current.
i) Mechanical rigidity.

Stability and reproducibility are enhanced by the realization of a, b, e, f and i.

Sensitivity is affected by g and c. Amplification factor is of comparatively little importance in this type of work since the output change indicator (galvanometer) is essentially a current device. This explains the need of high mutual conductance

$$\frac{\triangle \text{ plate current}}{\triangle \text{ grid potential}}$$

and the desirability of having a plate impedance of the order of magnitude of the galvanometer.

Accuracy demands that conditions d and h be attained. A simple application of Ohm's Law will show that if the potential of a system having a resistance af 10^8 ohms is desired to a tenth of a millivolt (a typical problem) the current drawn must not exceed 10^{-12} amperes a millionth of a microampere.

Study of Tube Characteristics.

These will be discussed on the basis of utility rather than order of measurement since many of the tubes (the best ones) were not available for the early work.

Under normal operating conditions the mutual conductance curves of the ordinary triodes are well-known so they will not be considered further. All ordinary triodes suffer from the danger of increasing leakage from grid to filament with time and season especially in the chemical laboratory where complete elimination of fumes and excessive moisture is a rare condition. Neglecting filament power requirements, the following is the order of suitability for measurements under conditions which will be described later: — 31, — 12 A, — 20, — 30, — 99, — 01 A, — 71 A. In the older types, lack of mechanical rigidity is the rule rather than the exception and the elements may shift with respect to one another with even slight vibration of the table or other support. The filament is the worst offender since it is inherently less rigid and becomes softer when heated to operating temperature. A slight change in absolute distance from filament to grid, is a large relative change and this alters the entire characteristics of the tube.

For the same general reasons as outlined above, tetrodes may be arranged in order of their preference: — 32, — 24, — 22. They have the advantage that a high mutual conductance and a high amplification factor may be realized in the same tube — a condition not possible with the triode. The plate impedance is much higher than that of triodes generally (400,000—800,000 ohms). This makes them less suitable where a galvanometer is used in a bridge of which the plate circuit forms one arm since most galvanometers have a resistance of a considerably lower order of magnitude. As far as plate impedance is concerned, the tetrode is ideally suited for use where an additional stage of amplification is employed. There is a serious fault however. Increasing the number of elements increases the necessity for careful mechanical design, and since ordinary tetrodes are not constructed for use in precision instruments they do not satisfactorily meet this requirement. This will be realized from a simple experiment. A tetrode was arranged in the type of circuit denoted above as 2 b. The galvanometer was brought to zero. A sharp rap on the table necessitated a change of approximately 5000 ohms in the adjoining arm before the galvanometer could again be brought to zero.

Several forms of apparatus using the tetrode in this type of circuit have been suggested and while good work can unquestionably be done with them, they cannot satisfactorily be employed by the average worker.

Experiments on a specially designed battery type of power pentode yielded some interesting results. (These should not be confused with the pentodes available for radio frequency amplification

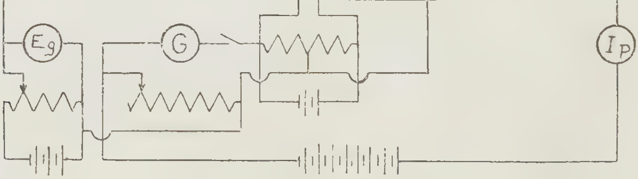


Figure 2.
Circuit for Determining Pentode Characteristics.

which in general, behave like the tetrodes of the present discussion.) For reasons which will be evident later, a somewhat unusual circuit was used to obtain the various characteristics (Figure 2). Only a small part of the data taken on a single tube will be illustrated. Throughout the data given, plate current will be understood to mean plate plus screen grid currents since it was found that the effective mutual conductance of the tube was increased under these working conditions.

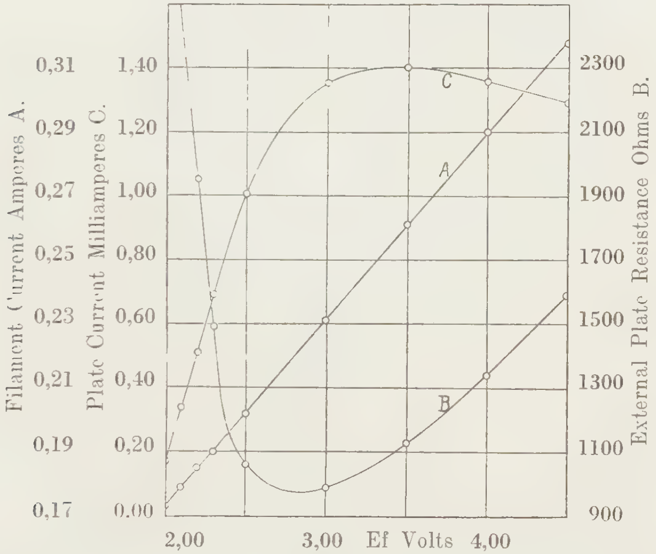


Figure 3.
Plate and Filament Characteristics
of Pentode.
Ep=22,5 Volts.
Grid Circuit Open.

Figure 3 A, shows how filament current changes with filament potential. B and C represent external plate resistance and plate current variation respectively with filament voltage. The external plate resistance is always such that when its value is multiplied by the plate current, the product equals half the applied filament potential. It will be noted that the external plate resistance has a maximum value at a different filament voltage from that required

for minimum plate current. This is due to the fact that the free gird potential is not the same under these two conditions.

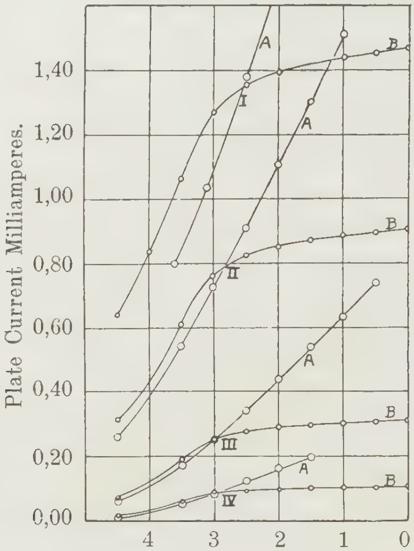


Figure 4.
Eg Negative Volts.

Ep Volts
I 22,5
II 18,0
III 12,0
IV 7,80

Since the satisfactory tube must be capable of measuring the E. M. F. of cells of high resistance, mutual conductance curves were taken (Figure 4) with 10^8 ohms in the grid circuit (B) and with zero external grid resistance (A), respectively. Higher values of plate potential were employed but are not shown since they were later found unnecessary. The grid resistor was constructed from a broad line of India ink drawn with a ruling pen on bond paper which, in turn was shellaced to an oak strip. Its accuracy was $\pm 1\%$ and it did not vary beyond this value under day to day laboratory humidity and temperature changes. External plate resistances were of such a value that when multiplied by the plate current at open grid the product equalled 2,0. (As previously mentioned, the external plate resistance is adjusted so that its value when multiplied by the plate current equals one half of the applied filament potential. This particular tube was operated at a filament potential of 4,0 volts).

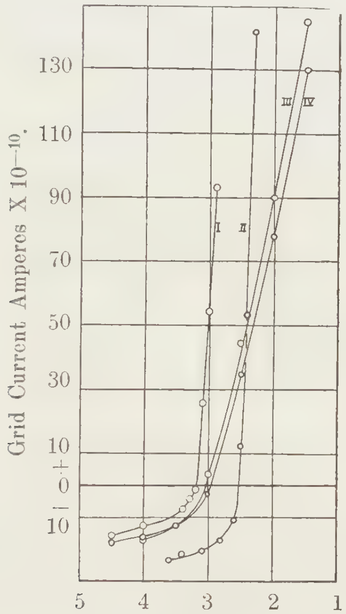


Figure 5.

Negative Grid Volts.

I Ep = 7,80 Volts Rg = 0
II Ep = 2,25 Volts Rg = 0
III Ep = 7,80 Volts Rg = 10^8
IV Ep = 2,25 Volts Rg = 10^8

A study of pentode grid current variation with applied grid potential resulted in the curves shown in Figure 5. The tube employed was very free from gas and at the low plate potentials employed, no positive ion minimum was noted in the grid current curves[6].

Design of Circuit.

A study of the characteristics shown above and many others, together with existing circuit diagrams and available portable galvanometers, showed that the various constants might be assembled with fair matching of values.

---

[6] cf. Nottingham, J. Franklin Inst., **209**, 287 (1930).

With the principles outlined in the early part of the paper in mind, the assembly shown in Figure 6 was set up. (It will be noted that, for simplicity, a triode is illustrated since the principle is the same as when a tetrode or pentode is used.)

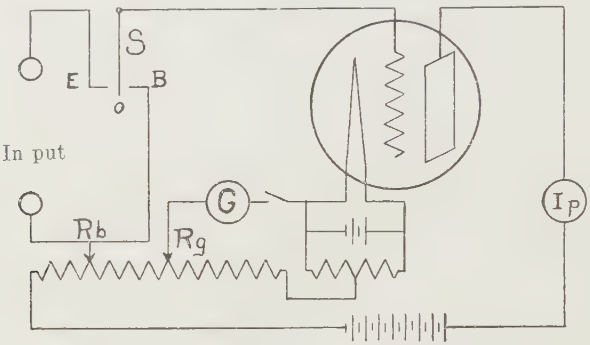


Figure 6.

Circuit of Vacuum Tube
Galvanometer

The filament is operated directly from one, two or three storage cells in series depending on the type of tube used. All valves with oxide coated five volt filaments will operate satisfactorily at four volts thereby eliminating a series resistor. If a series resistor is used, one of fixed value is recommended. Elimination of a filament circuit switch also removes a possible source of trouble. The parallel, mid-tapped, fixed, filament circuit resistor may have a value of from fifty to one hundred ohms.

The plate circuit contains, for convenience, a milliammeter Ip (1,5 M. A.) to indicate current flow in the circuit. The accuracy of this instrument is unimportant since no actual current readings need be taken. The battery should be of "heavy duty" type cells and may vary in value from about fifteen to twenty-one volts depending on the particular tube used. (Although only about one milliampere is required from this battery, large size cells should be employed to obviate any effects which might be due to changing internal resistance of the cells or changing degree of polarization.)

If the gas content of the tube is low, the higher value may be used. Generally however, the stability of the device will be impaired if voltages in excess of fifteen are employed. This is because of varying currents caused by the resulting ionization of residual gases (mainly carbon monoxide and hydrogen) in the tube. In cases where stability may be sacrificed for sensitivity, much higher applied plate potentials will be beneficial. The values of resistance necessary to get the proper Rb and Rg settings will also depend upon the tube used. The value of Rg is such that, with the grid circuit open, the product of the plate current multiplied by the Rg value will equal half the applied filament potential. With the same plate current flowing, Rb must usually be at a point more negative than Rg (with respect to the filament) by about 0.5 volt. The limits so far noted with various tubes have been between 0.05 and 1.2 volts under satisfactory working conditions.

Galvanometer, G, is a portable, pointer type instrument having a sensitivity of 8 millimeters per microampere. In addition to the tapping key shown, it is well to provide another having in series a protective resistor of between 10,000 and 50,000 ohms for preliminary adjustments.

Switch, S, should be of high resistance between contacts and of low capacity beween open contacts.

Connecting Rb to ground will usually be advisable and for some types of work, the entire device may need to be electrostatically shielded. For glass electrode work, however, with well-made membranes of suitable glass the author has found shielding unnecessary. Adjustments of the circuit while the grid circuit is open will be facilitated if the vacuum tube and switch S are within a shield.

Method of Operation.

With Figure 6 in mind, the apparatus should be connected in the desired measuring circuit with the input terminals replacing those of an electrometer or high resistance, high sensitivity galvanometer of the conventional circuit.

The device is allowed to operate from fifteen to forty minutes depending upon the various circuit constants and the vacuum tube construction to establish steady operating conditions and thereby obviate the necessity for frequent checking of the proper operating point.

With switch S at position O, Rg is adjusted until galvanometer G gives no defection when the key is closed. Rg is now at the same potential as the negative end of the filament because of the IR drop along the plate resistor. At present, no current is flowing in the external grid circuit since it is open. Switch S is now placed at position B and Rb is adjusted until galvanometer G again reads zero when the key is pressed. The grid should now be at the same closed circuit potential as it formerly was in open circuit and (similarly to the open circuit conditions) no grid current is flowing in the external closed circuit. If now S is placed at O and G still gives no deflection when the key is closed proper adjustment is assured. If the no-courrent condition through G has not been preserved, it is simply necessary to carefully repeat the initial process.

Switch S is placed at E and the device is ready for measurement.

Limitations and Precautions.

The advisability or necessity for shielding under varying conditions has been mentioned under "Design of Circuit".

Drift to a slight extent is always to be expected. Under good conditions drift may be limited to the equivalent of five mill-volts per hour or less. For general work, three or four times this value can be tolerated. If the drift changes in direction over a period of a few minutes and seems to lack uniform trend in one direction the trouble may usually be traced to electrical strays or to faulty mechanical construction. The last named trouble may often be traced to the tube and may be definitely proven as indicated in the following paragraph. Figure 7 shows the type of drift characteristic to be expected. This example was purposely taken under generally unfavorable conditions. The tube was of the pentode type which, because of its many elements, is slow in reaching thermal equilibrium and the filament battery had just been removed from "charge".

Mechanical vibration is always to be avoided, especially when the older types of tubes are employed. With the newer designs,

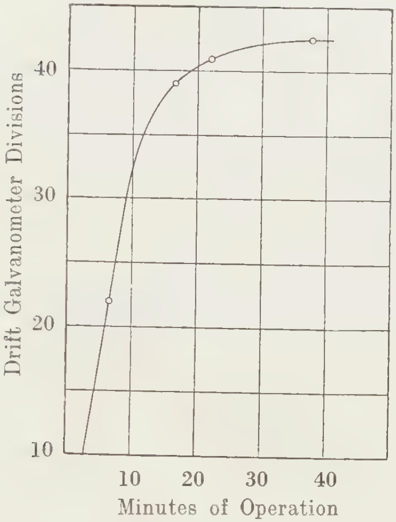


Figure 7.
Drift Characteristic.

the tube may be deliberately jarred or hit without noticeable or detrimental effect.

Insulation should be such that the external leakage possibilities are not comparable in magnitude with the conductance of the circuit being measured. The writer has found that dry clean wood is generally satisfactory for a circuit resistance of 100 megohms or less.

Stirring should be avoided during glass electrode measurements as a spurious charge is induced on the glass which is slow to leak off. In making comparisons with the hydrogen electrode, care should be taken that no hydrogen is bubbling through the solution when the glass electrode measurement is being made. Under some conditions the writer has noted a change of potential as great as 0,2 V., probably caused by induced frictional charges being produced by the gas and dissipated by the glass membrane, at constant rates.

Fumes and excessive humidity are likely to cause troublesome base leakage at the tube and protection from these should be provided where the case demands. Generally, a tube with control grid brought through the top of the glass envelope is to be preferred but it is usually unnecessary. Measurement of the cold grid to filament resistance of some triodes having new, clean bases averaged about 6400 megohms. This value, of course, includes internal leakage which is practically constant and will remain so.

General Performance.

Figure 9 shows what can be expected of the device when used with a glass electrode in the POGGENDORF circuit using a student type potentiometer. Measurements were carried out at 26,2° ± 0,1°.

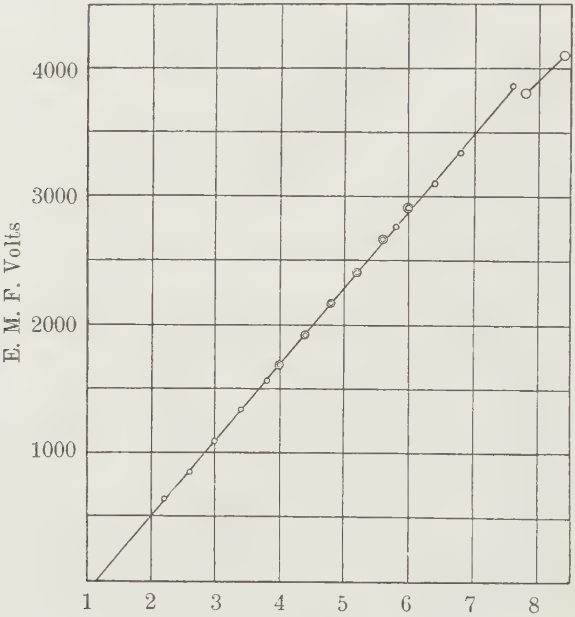


Figure 9.
Glass Electrode Potentials against
Clark and Lubs Buffers.

The most representative curve gives the slope demanded by the Nernst equation with an accuracy of 0,1% and a probable error in the worst case of 0,3%. (Buffer solutions of pH values of 7,8 and greater were subsequently found to have been made from defective reagents, and since the glass electrode is known to deviate from the hydrogen electrode beyond this range, the measurements were not repeated.)

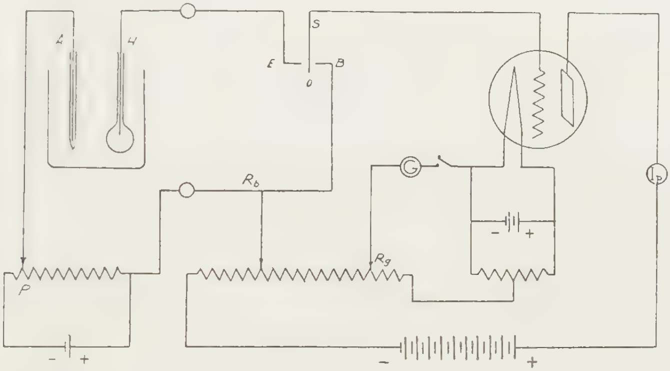


Figure 8.

Complete Arrangement for Glass Electrode Measurements.

Figure 8 shows the complete set-up for glass electrode measurements. P represents schematically a standard method for obtaining an opposing potential of known value. H is a glass electrode which for the present measurements contained a saturated solution of silver chloride in 0,1000 normal HCl with a silver wire making contact with the inner solution. A is a silver chloride electrode in 0,1000 normal KCl.

An idea of the comparative rapidity with which measurements may be made, will be evident from the fact that the author with an assistant measured the pH of twenty-seven solutions in approximately two hours. Three measurements on each solution were made and the apparatus was checked approximately fifty times in this period.

Acknowledgments.

The author wishes to express his indebtedness to Dr. S. J. Broderick who assisted him in making many of the measurements, to Professor H. A. Iddles for placing at his disposal working facilities at the University of New Hampshire in the summer of 1930, to Mr. L. M. Temple of the Union Carbide and

Carbon Corporation, to Mr. Walter Krahl of the Arcturus Radio Tube Corporation and to Dr. E. R. Wagner and Mr. Eugene Bruyning of the Duovac Radio Tube Corporation for supplying tubes of special design and electrical characteristics.

Conclusion.

The above treatment has been made very general and somewhat in detail, but the author feels that the type and number of inquiries on the subject have warranted it. Also the fact that almost each month sees new tubes available and that workers in foreign countries often have difficulty in securing American-made tubes seem to make such a procedure advisable.

Summary.

A null instrument has been described which employs an electron tube in a simple circuit. The device operates at the theoretical no-current point and is especially useful in circuits containing high resistances or easily polarized electrodes.

PHOTOELECTRIC COLORIMETRY V; APPLICATIONS OF THE "SPERRSCHICHT" TYPE PHOTOELECTRIC CELLS.

By

RALPH H. MÜLLER.

Contribution from the Chemical Laboratory of the Washington Square College
of New York University, New York, N. Y.

(Received April 19, 1932.)

Previous studies[1, 2, 3, 4] in this laboratory have shown that the methods of photoelectric photometry can be applied to colorimetric analysis on a macro or micro basis.

With the advent of the "Sperrschicht" or boundary-type cells the whole problem is very greatly simplified. The object of this communication is to review very briefly the important properties of these cells and show how they can be applied to colorimetric analysis.

According to HUGHES and DUBRIDGE[5] the photoelectric properties of Cu_2O — Cu rectifiers were first described by GRONDAHL[6]. LANGE[7] also observed the effect of light on this system and devised a cell shown schematically in Fig. 1. Massive copper is coated with a very thin film of Cu_2O and this in turn with a very thin, transparent film of metal. Connection is established between the two metals. We thus have two electrodes separated by the semi-

---

[1] R. H. MÜLLER and H. M. PARTRIDGE, J. Ind. and Eng. Chem., **20**, 423 (1928).

[2] R. H. MÜLLER and H. M. PARTRIDGE, J. Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed., 3, 169 (1931).

[3] A. S. WILLIAMS, R. H. MÜLLER and J. B. NIEDERL, Mikrochemie, **IX**, 268 (1931).

[4] R. H. MÜLLER, Mikrochemie, **X**, 285 (1931).

[5] HUGHES and DUBRIDGE, "Photoelectric Phenomena" McGraw-Hill Co., N. Y. 1932, p. 361.

[6] GRONDAHL, Science, 36, 306 (1926); J. Am. Inst. Elec. Eng., **46**, 215 (1927)

[7] LANGE, Physikal. Ztschr., **31**, 139 (1930); **31**, 964 (1930).

conductor cuprous-oxide. Upon illuminating the cell through the transparent metal film, electrons flow from the Cu_2O to the massive Cu plate. The current produced is directly proportional to the light intensity. LANGE's cell showed maximum sensitivity at 8000 A°. and was sensitive well into the infra-red. SCHOTTKY[8, 9] and

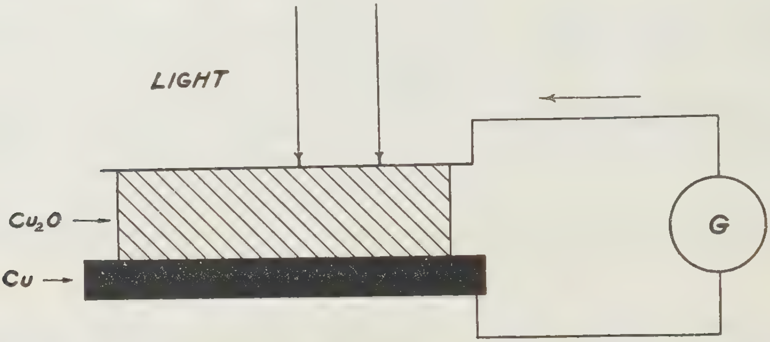


Fig. 1.

his co-workers have made an exhaustive theoretical and experimental study of the phenomena and established the more important properties of these devices. In LANGE's cell the photo-effect occurs at the back boundary. This accounts for the large red-sensitivity, since Cu_2O acts as a red filter as shown by PFUND[10]. By suitable construction SCHOTTKY succeeded in establishing a front boundary with large rectifying action. Cells of this type are sensitive to shorter wave lengths and can be made to approximate the human visibility response. Since these cells require no external battery, i. e., developp an e. m. f. of their own, it was natural to assume that they are photo-voltaic cells. The formal analogy with the Becquerel effect also suggests this. AUWERS and KERSCHBAUM[11] have shown very conclusively that this is erroneous and that current rather than potential is fundamental. Their results show that the number of photoelectrons crossing the boundary is strictly proportional to the light intensity. Thus, the short circuit current is directly proportional to the light intensity; the open circuit

---

[8] W. SCHOTTKY, Physikal. Ztschr., **31**, 913 (1930).

[9] E. DUHME and W. SCHOTTKY, Naturwiss., **18**, 735 (1930).

[10] PFUND, Phys. Rev., **34**, 370 (1912); **7**, 289 (1916).

[11] O. AUWERS and H. KERSCHBAUM, Ann. Physik (5) **7**, 129 (1930).

potential is not. It is pointless to discuss all the reasons and evidence in favor of this view as it so adequately discussed in the above and other papers[12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

The studies herein reported were made with cells of this general type. They are the Weston "Photronic" cells*. Although no details have been published concerning their construction or the composition of the cell elements they are identical in their properties with the "Sperrschicht" type of LANGE and SCHOTTKY. According to BERGMANN very efficient cells are obtained** which consist of a "Sperrschicht" between iron and selenium, with silver sputtered over the Se as a collector.

Calibration and Linearity of Response.

In applying photoelectric cells to colorimetry, it is highly desirable to calibrate them carefully for wave length and intensity response. The latter is the more important. The spectral response curve given by the manufacturer was checked roughly and found to be similar to the visibility curve except in that the maximum occurred near 5800 A° U. instead of 5500, as in the visibility function. The light-intensity current relation was established in the following manner. The cell was illuminated with parallel light from a 42 cp. automobile lamp. Wire screens were introduced in the light beam and the photoelectric current measured alternately with and without the screens. The screens were oscillated slightly during each measurement. The screens were previously shown to

---

[12] BERGMANN, Physikal. Ztschr., **31**, 375 (1931).

[13] GRAFFUNDER, Physikal. Ztschr., **31**, 375 (1931).

[14] H. KERSCHBAUM, Naturwiss., **18**, 832 (1930).

[15] TEICHMANN, Physikal. Ztschr., **32**, 216 (1931).

[16] TEICHMANN, Ztschr. Physik, **65**, 709 (1930); **67**, 192 (1931).

[17] DUHME, Ztschr. Elektrochem., **37**, pp. 682—684 (1931).

[18] PERUCCA and DEAGLIO, Ann. d. Physik, **10**, 3, p. 257—262 (1931).

[19] O. AUWERS and H. KERSCHBAUM, Ann. d. Physik, **10**, 3, p. 262 (1931).

[20] DUBAR, Compt. rend. Acad. Sciences, **193**, p. 659—661 (1931).

[21] PERUCCA and DEAGLIO, Ztschr. Physik, **72**, 1—2, p. 102—115 (1931).

[22] VON KÖRÖSY and SELÉNYI, Physikal. Ztschr., **32**, p. 847—850 (1931).

[23] LANGE, Physikal. Ztschr., **32**, p. 850—856 (1931).

[24] DEMBER, Physikal. Ztschr., **32**, 856—858 (1931).

* Model 594 Photronic Cell. Obtainable from the Weston Electrical Instrument Corp. Waverly Park, Newark, N. J., U. S. A.

** From the S. A. F. Nürnberg.

be practically non-selective and had been calibrated by three independent methods:

a) Cs photoelectric cell and galvanometer, using Hg lines.

b) Stupho-Gradation Photometer (Zeiss).

c) Moll thermopile and amplifier*.

These screens are re-calibrated periodically for other purposes and serve as standards for the laboratory.

By using various initial intensities (substituting other lamps burning at the same color temperature) and using the screens for interpolation, the light intensity could be varied over very wide ranges. The ratio of the photo-electric currents with and without the screen gives at once the transmission. Table I shows the values obtained in one series of measurements.

Table I.

No	Screen Transmission in %	% Transmission by Photronic Cell
1.	22,8	22,8
3.	34,6	34,7
4.	38,0	38,1
5.	39,4	39,6
6.	42,2	42,2
7.	58,7	58,7**

Fig. 2 shows a typical current-light intensity determination. The open circuit potential showed non-linearity as found by AUWERS and KERSCHBAUM.

This relation immediately reveals an important point to be observed in the use of the cell as a photometer. Since current and not e. m. f. is fundamental, the resistance of the measuring circuit is of importance. If it is very high severe departures from linearity will result. If the external resistance approaches infinity the current indicating device becomes, in effect, a high resistance voltmeter, and again we measure potential rather than true current.

This is best illustrated by Fig. 3 which shows a series of measurements made on Screen No. 7. It shows the measured % transmission as a function of the total external resistance. This

---

* I am indebted to my colleague Prof. W. WEST for this check determination which was made on an infra-red spectrometer assembly, and which thus permitted an estimate of the selectivity of the screens.

** See discussion below.

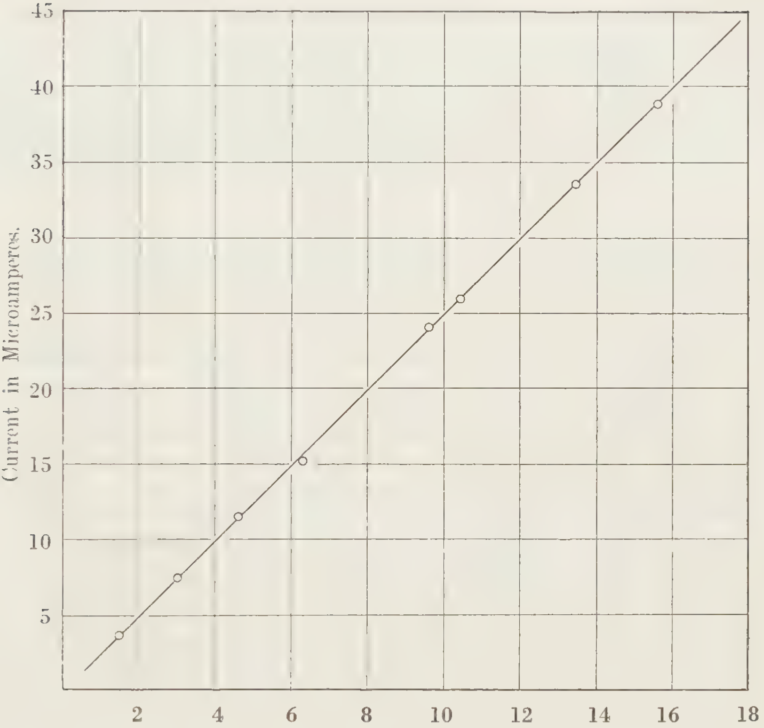


Fig. 2.

Light Intensity.

shows immediately the importance of measuring the short circuit current.

The simplest type of photometer suitable for colorimetry comprises the Photronic cell, a small incandescent lamp fitted with a suitable housing and lens system to render the light parallel, and an absorption cell. The arrangement is shown schematically in Fig. 4. Provision is also made for a light filter*.

---

* For careful work of high precision a monochromatic source of light such as a Hg arc is necessary. The Hg lines can be isolated by means of filters or better by a monochromator. The ideal arrangement for precise photoelectric spectrophotometry was established many years ago by VON HALBAN and his students, but an assembly as described by him is an elaborate piece of equipment hardly suitable for an analytical laboratory. In the following an attempt will be made to show what can be done under less ideal conditions. A heat filter is necessary in all cases where intense illumination prevails as found by TEICHMANN.

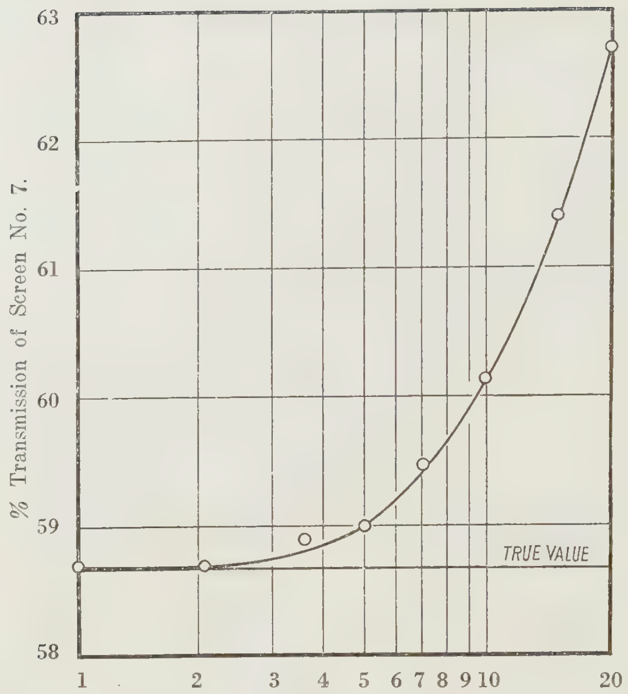


Fig. 3.

External Resistance in Ohms × 10^{-2}.

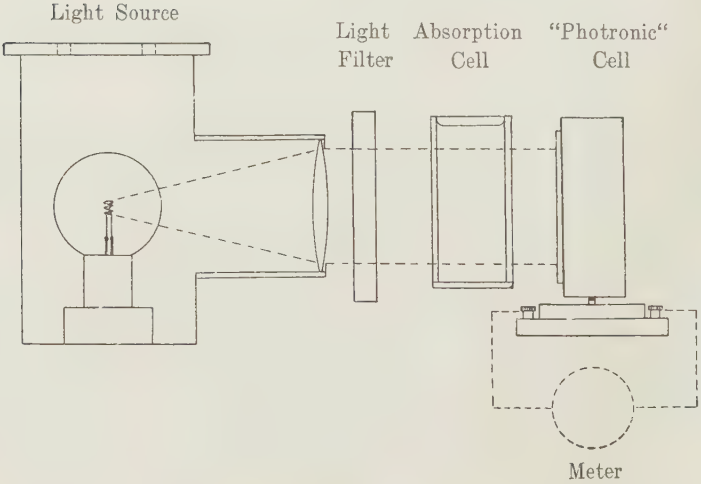

Light Source
Light Filter
Absorption Cell
"Photronic" Cell
Meter

Fig 4.

The photoelectric current is measured with a microammeter or even a milliammeter. A Weston Model 322 Microammeter 0—25 microamps: 125 scale div. has been used with success. For very high light intensities a 0—1 milliammeter has been used. Most of the measurements herein reported were made with the former

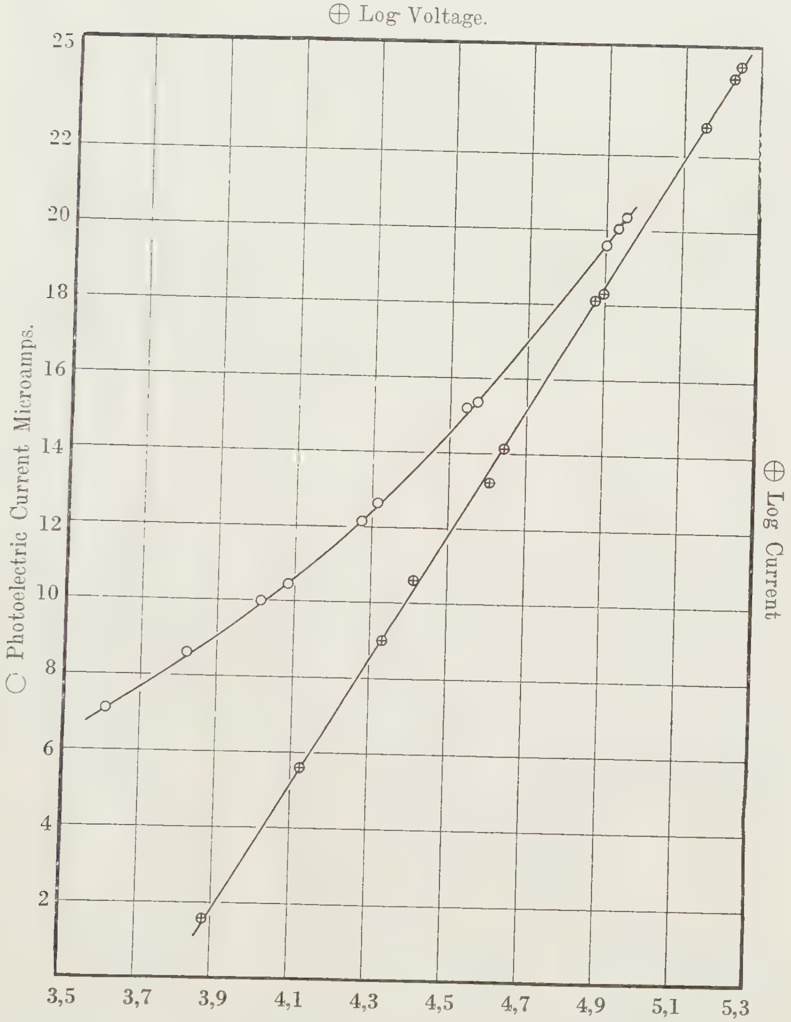


Fig. 5.

○ Lamp Voltage.

type. The incandescent lamp should be operated from a storage battery of high amp. hour capacity. If measurements are made in rapid succession that is: — absorption cell filled with water. then absorption cell with solution, any secular change of light intensity in the source will be small, in any case detectable. This is not true if the battery is nearly discharged. The readings can be made as reliable as desired by measuring the voltage across the lamp. Fig. 5 illustrates the dependance of the photoelectric current on the voltage across the lamp. It has been found* that the relationship can be expressed in the form $I = kV^n$ where I = P. E. current, V = lamp voltage and k and n are constants. The value of n lies between 3 and 4. The constants have not been evaluated in this case as they vary from one lamp to another. The logarithmic plot however shows the relationship ($n = 3{,}5$ in this case). The change in current due to variations in the lamp voltage is a composite effect, of course. Not only does the intensity of the light change but the spectral distribution shifts with temperature. This together with the selectivity of the cell accounts for the high value of n.

It can be seen from this that the attainment of a photometric precision of 0,1% requires constant voltage across the lamp to the extent of some 2 millivolts. This means that during the time required to effect substitution of the samples, the lamp voltage variation must not exceed this variation limit. It is felt that this factor has been quite generally neglected in photo-electric photometry and has given rise, in many cases to an abandonment of the single cell method. Also in many cases, non-reproducibility of response has been ascribed to the photo-cell, the questionable assumption being made than an incandescent lamp must be constant if it is operated by a well charged storage battery.

Optical Considerations in Physical Colorimetry.

No attempt will be made here to present in detail, the optical principles involved in physical colorimetry. These are set forth in many elementary treatises on optics and experimental physical chemistry. The following simple considerations are regarded as essential to an intelligent application of photoelectric methods.

---

* A comprehensive study of various light sources suitable for photoelectric measurements has been made in this laboratory and will appear soon in the Journal of the Optical Society of America.

For colored solutions measured in a cell of definite and constant thickness, BEER's Law states:

$$I = I_0 e^{-kc}$$

Where I_0 = intensity of incident light
I = intensity of emergent light
c = conc. of colored substance expressed in convenient units
k = const. (num. value depend. on units employed).

This applies only to monochromatic light and therefore k changes with the wave length. In addition many substances do not obey BEER's Law even at a given wave length, i. e., many colloidal solutions, electrolytes in which the absorption spectrum changes with dilution, due to ionization; complex formation etc.

In cases where it does apply, the colorimetric problem is greatly simplified by the following consideration

$$\frac{I_0}{I} = e^{kc} \text{ and } \log \frac{I_0}{I} = kc$$

Hence, if the values of $\log \frac{I_0}{I}$ are plotted as ordinates against concentration as abscissae, a straight line will result which passes through the origin and has a slope equal to k. This relationship holds very precisely under the conditions mentioned above, but for many instances where very dilute solutions are to be measured and a fairly selective light filter is employed a straight line can be obtained. This is shown below by several representative examples. The convenience of the straight line relationship is apparent in that the system can be checked by one standard solution and all succeeding samples are computed from a knowledge of k, the absorption constant and a single reading of I. A careful choice of concentrations, absorption cell thickness and light filter enables one to realize these conditions. The less desirable empirical calibration, i. e. photoelectric current — concentration curve, always remains as a final resort.

Representative Measurements.

Potassium Permanganate.

The colorimetric determination of the permanganate ion is very important in view of the many direct and indirect analyses which can be made involving this ion. The $\overline{MnO_4}$-ion is characterized by several sharp absorption bands at 570—485 mμ.

Curve I, Fig. 6 shows the results obtained without a light filter. The initial part of the curve shows a systematic deviation from the straight line to be expected on the basis of Beer's law. Above a concentration of 0,0025 N the values of log $\frac{I_0}{I}$ rise far to rapidly. This random behavior is apparent only when the values are plotted in accordance with Beer's law; a simple plot of photo-electric current against concentration gives a fairly smooth curve. This shows that an empirical relationship may suffice for analytical purposes but may be far from fundamental. The reason for the anomalous behavior is as follows. The Photronic cell employed here has maximum response in the vicinity of 5800 A° U. The incandescent lamp source, however has an energy maximum in the infra-red. The resultant response therefore will be in the red. Since permanganate transmits well in this region it will have very little effect on the observed photoelectric current. Only green light will be absorbed, and after the absorption in this region is fairly complete, increasing concentration of permanganate ion will cause only a very small absorption of red light.

Curve III, Fig. 6 shows the results obtained using a dense green filter (Corning Sextant-green G-401 C. Z.). The total current is now much smaller due to the complete elimination of long wave lengths. It will be seen that a straight line relationship obtains up to a concentration of 0,0028 N. Above this a systematic deviation occurs, again due to a lack of strict monochromaticity. The range over which the linear behavior occurs cannot be stated definitely of course. It depends upon the following factors.

1. Total intensity and energy distribution of the light source.
2. Density and spectral transmission of filter employed.

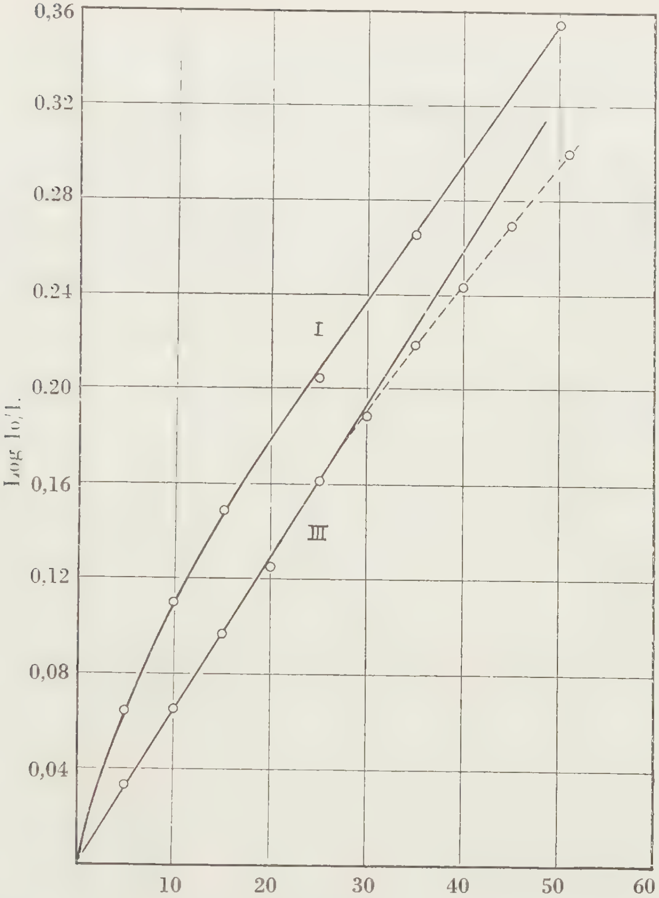


Fig. 6.

Concentration $KMnO_4$ $N \times 10^4$

3. Thickness of absorbing layer of solution.
4. Concentration of solution.

A simple and rapid method for determining the best conditions for a given solution will now be described.

1. First find the spectral region in which maximum light absorption occurs. This can be done with the aid of a small spectrometer. In many cases the location of the bands can be found in the literature.

2. Select a light filter having its maximum transmission in this

region. Unless red light is desired, it is important* to see that the red end of the spectrum is cut off by the filter, for the reasons mentioned above.

3. With the light source operating at constant voltage, and filter in place, measure the photoelectric current produced, when the absorption cell is filled with distilled water. Since the current is proportional to the intensity we can call this value I_0. Re-determine the current after the cell contents are replaced by the solution. Call this value I. For this solution and succeeding concentrations, the values of $\log \frac{I_0}{I}$ will be proportional to the concentration. In order to establish the upper limit of concentration at which this will still be true it is not necessary to perform all the calculations, but merely plot the I values against the corresponding concentrations, using semi-logarithmic paper. The I values are entered on the logarithmic ordinate scale; concentrations on the linear abscissae. A straight line will result which will begin to show deviations at high concentrations. The concentration range within which the log I, c relation is linear will then be evident at a glance and will tell within what limits solutions can be measured precisely. The values within this limit can then be recomputed and plotted on the $\log \frac{I_0}{I}$, c basis and k can be computed or estimated graphically from the slope of the curve.

In Fig. 7 typical results are presented for a number of dyes, some of which were measured with several filters. In general a poorly chosen filter will result in a low value of the slope, that is, the light intensity will change very slightly with a change of concentration. In all cases the highest concentrations were so chosen as to be too dilute for accurate matching in an ordinary colorimeter. Survey measurements of this type enable one to establish the ideal conditions and limitations with the least delay.

Standard colorimetric methods are now being reinvestigated in this Laboratory in order to adapt them or modify them to suit the photoelectric procedure. The following table illustrates some

---

[*] A very complete set of filters is available from the Corning Glans Co. Filters also afford a very wide choice, but must be very carefully protected from overheating Schott-Jena filters are also suitable.

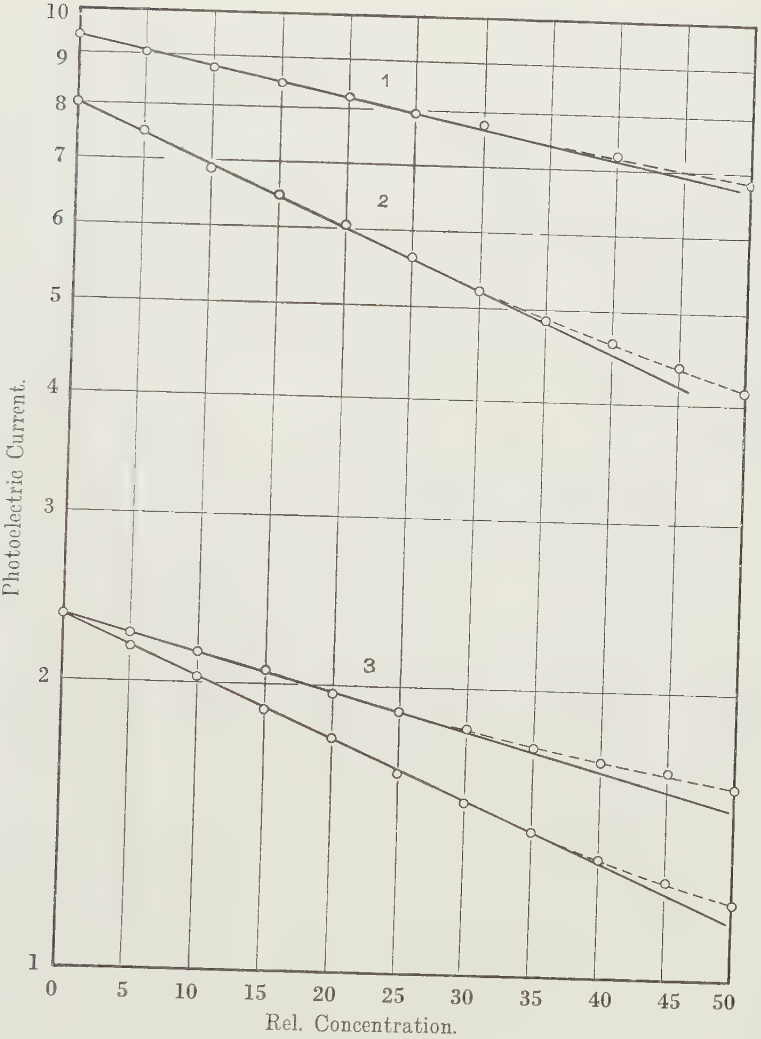


Fig. 7.

1. Aniline Green, Red Filter;
2. Magdala Red, Corex Green Filter;
3. Methyl Violet, Sextant Green Filter;
4. $KMnO_4$, Sextant Green Filter.

results on micro copper determinations made by Mr. H. H. Browne. The samples were brass wire and an analysis of the copper content was made on the usual macro scale by the volumetric iodide method. The colorimetric procedure involved the addition of excess NH_4OH and measurement of the resulting blue solutions. A careful study of all the conditions, i. e. conc. of NH_4OH, cell thickness, filters, etc. led to an evaluation of the constant, $k = 0{,}000527$ where concentrations are expressed in mg. Cu per liter (approx. = parts per million).

Table.

Cu content of Brass Wire. $k = 0{,}000527$.

Sample No.	% Cu Volumetric	% Cu Colorimetric
5	64,1	64,4
6	64,6	64,5
8	64,0	63,9
9	63,9	64,3

Average (Volumetric) = 64,15% ± 0,23
Average (Colorimetric) = 64,28% ± 0,19

It is believed that a careful investigation of procedures will enable the analyst to use the single-cell method with appropriate filters, for most analytical determinations. The filter method of isolating light from a continuous source is far from ideal but it is evident from the above that precise results can be obtained within certain limits. True monochromatic sources of light involve expensive equipment, and it often happens that the source lacks powerful lines in very important regions of the spectrum.

Plate I illustrates a portable colorimeter of this type which has been used for some of this work. It is provided with two symmetrically placed cells with separate optical systems illuminated by one lamp. Either cell can be used separately, or the two can be opposed, if it is desired to match two solutions. In addition one cell can be used for photometering and the second one can be used to check the constancy of the light sources.

It is a pleasure to record my indebtedness to the following gentlemen for assistance in some of these measurements. Mr. A. Spector, Mr. A. Glasoe and Dr. R. L. Garman.

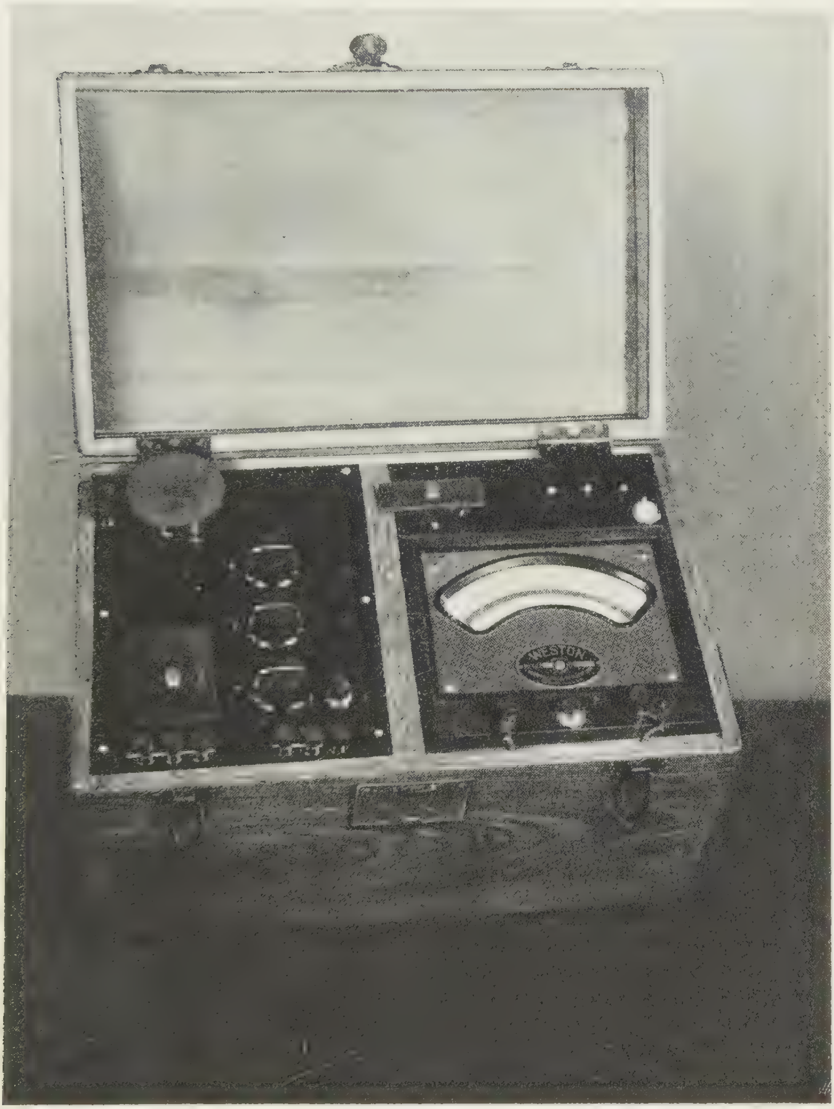


Plate 1.

Summary.

1. The "Sperrschicht" type cells have been investigated with respect to their physical properties and the conditions for precise photometry have been established.

2. In conformity with the findings of previous workers, the short circuit current was found to be proportional to the light intensity.

3. It has been shown that variations in voltage across the light source constitute one of the most important objections to the single cell method of photometry. The requisite voltage constancy is easily determined from a simple exponential law.

4. It has been found that the proper choice of filter, absorption cell thickness, and concentration of the solution will enable one to satisfy Beer's law and greatly simplify measurements.

5. Photoelectric methods should enable the analyst to avail himself of all the advantages of colorimeter analysis and in addition increase the speed and precision of determinations. Fatigue in the observer is reduced to a minimum.

SAMMELREFERAT.

MIKROPHYSIK UND MIKROCHEMIE IN DER BIOLOGIE UND MEDIZIN*).

Von

JOSEF GICKLHORN

(Prag).

(Eingelangt am 20. August 1931.)

I.

Das Thema und die besonderen äußeren Umstände des Vortrages legen es nahe, den sachlichen Ausführungen einige orientierende Bemerkungen voranzuschicken.

Zunächst muß ich darauf hinweisen, daß ich dank einer freundlichen Einladung Gelegenheit habe, als Biologe zu Medizinern über zwei Arbeitsgebiete zu sprechen, an welchen Biologie und

---

*) Nach einem am 15. Mai 1931 im Verein deutscher Ärzte in Prag gehaltenen Vortrag. Der Vortragston wurde absichtlich beibehalten, obwohl das Manuskript an Hand von Notizen in der vorliegenden Fassung erst Ende Juli druckfertig geschrieben wurde, und zwar nach freundlicher Aufforderung des Herrn Verlegers. Der Aufbau des seinerzeit frei gesprochenen Vortrages ist hier in den großen Zügen wohl unverändert erhalten; im Interesse des Lesers wurden aber Beschreibung und Diskussion der Methoden viel ausführlicher gehalten, weiters ergänzende Fußnoten und einige Literaturangaben hinzugefügt; außerdem wurde manches aus einer früheren „Programmschrift" übernommen (siehe GICKLHORN: „Mikrochemie und Mikrophysik — ihre biologische Auswertung in Gegenwart und Zukunft." Protoplasma, II. Bd., 1927. — Verl. BORNTRÄGER, Berlin und Leipzig). Da sich seit dieser Publikation (1926/27) sachlich wenig geändert hat, halte ich die dort diskutierten Fragen und Forderungen auch heute noch für aktuell. Obwohl die genannte Studie für Biologen bestimmt war, dürften einzelne Punkte, besonders die Beispiele und ergänzenden Zusätze, auch für den Chemiker beachtenswert sein.

Medizin entweder direkt oder indirekt in gleichem Maße interessiert sind. Diese Meinung bedarf bezüglich der Mikrochemie wohl keiner eigenen Begründung. Bezüglich der Mikrophysik ist die derzeitige Situation aber so, daß die Tendenz meiner Ausführungen in erster Linie darin bestehen soll, die Notwendigkeit und Dringlichkeit mikrophysikalischer Methoden neben mikrochemischen in der Biologie und Medizin hervorzuheben und die Grundlagen und Leistungsfähigkeit typischer Methoden als Beispiele zu demonstrieren. Man begegnet unter Biologen und Medizinern vielfach der Meinung, daß die Biochemie ungleich aufschlußreicher, daher wichtiger ist als die Biophysik — abgesehen von relativ wenigen Fällen —, und daß dies noch viel mehr für die in Betracht kommenden Mikromethoden zutreffen soll. Dieses Urteil ist zwar verständlich, es ist aber doch nur ein Vorurteil und kann nicht mit sachlich einwandfreien Argumenten begründet werden. Späteren Ausführungen vorgreifend, möchte ich deshalb gleich auf eine Tatsache hinweisen, die allein schon das heute so auffällige Mißverhältnis zwischen Biochemie und Biophysik und noch mehr zwischen ihren Mikromethoden begreiflich erscheinen läßt. Es gibt heute eben nur wenige Biologen und Mediziner, die die Bedeutung und Tragweite einer biologisch auswertbaren Mikrophysik mit voller Klarheit sehen; noch viel kleiner ist die Zahl jener, die sich mit dieser Erkenntnis nicht zufrieden geben, die mikrophysikalische Methoden nicht bloß „möglich und gewiß auch wünschenswert" halten, sondern die an ihrem Ausbau arbeiten und überdies in Wort und Schrift für eine Mikrophysik werben. Es scheint deshalb auf den ersten Blick im gegenwärtigen Zeitpunkt alles dagegen zu sprechen, wenn ich meinen Ausführungen die Behauptung voranstelle, daß für die Biologie und ebenso die Medizin die Mikrophysik nicht nur eine der nächsten, sondern auch eine der dringlichsten und sicher eine der fruchtbarsten Etappen im Ausbau neuer Arbeitsmethoden ist. Wenn ich versuche, im Rahmen einer knappen Vortragsstunde den Beweis für diese Behauptung anzutreten, so können meine Ausführungen selbstverständlich nur skizzierend sein. Ich hoffe aber doch, daß an speziellen Beispielen und einigen allgemeinen Gesichtspunkten das Prinzipielle überzeugend hervortritt; ebenso hoffe ich, und zwar gestützt auf mehrjährige eigene Beobachtungen und Erfahrungen besonders bei Vitalfärbungen tierischer und pflanzlicher Versuchsobjekte bzw. bei Studien zur experimentellen Zellforschung, einige naheliegende Bedenken oder Einwände zu zerstreuen, welche die zentrale Frage betreffen, nämlich die nach der Möglichkeit und Dringlichkeit einer Mikrophysik. Natürlich meine ich vor allem solche Methoden, welche den speziellen Forderungen, Zielen und Arbeitsbedingungen des Biologen und Mediziners angepaßt sind. (Siehe dazu die Ausführungen S. 646.)

Ich muß weiters bemerken, daß der Titel des Vortrages insofern zu weit gefaßt ist, als ich nicht die Absicht habe — in der kurzen Zeit auch nicht die Möglichkeit hätte —, Mikrochemie und Mikrophysik in gleicher Ausführlichkeit zu behandeln. Ich stelle vielmehr die Mikrophysik in den Vordergrund, ohne damit ein Werturteil zu fällen. Dieses Vorgehen kann ich damit rechtfertigen, daß heutzutage wohl jeder Biologe und Mediziner — sofern sein Interessenkreis nicht allzu klein ist — über die Grundlagen, Methoden, Ziele, Erfolge, Vorteile und Grenzen der Mikrochemie orientiert ist oder, falls er es noch nicht sein sollte, sich leicht an Hand einführender Werke und Sammelreferate orientieren kann. Bezüglich der Mikrophysik ist das leider nicht der Fall und viele bereits vorliegende Methoden sind vermutlich nur mangels einer übersichtlichen und leicht zugänglichen Zusammenfassung den meisten Biologen und Medizinern unbekannt. — Sollte ich hier ausführlicher auch über Mikrochemie sprechen, dann müßte ich Vieles überflüssigerweise wiederholen, ohne Neues sagen oder Anregung geben zu können. Für die weiteren Ausführungen soll die Mikrochemie nur Ausgangspunkt sein; sie soll zum Vergleich dienen, um beim gegenwärtigen Stand der Mikrochemie und Mikrophysik bloß durch den Kontrast eine sachlich unhaltbare Situation hervortreten zu lassen. Dadurch dürfte auch am einfachsten gezeigt werden können, daß diese zwei Gebiete sinngemäß zusammen gehören und sich namentlich bei ihrer Auswertung in der experimentellen Biologie oder Medizin gegenseitig ergänzen und fördern müssen, keinesfalls aber als Konkurrenten auftreten. Wenn heute die Mikrochemie führend ist, so liegt das vor allem daran, daß sich ihr alles Interesse zuwendet, daß es eine für den Biologen und Mediziner brauchbare Mikrochemie schon gibt, während eine Mikrophysik als Gegenstück zur angewandten Mikrochemie erst im Werden ist und nur in schrittweisem Vorgehen erarbeitet werden kann. — Ich will aber mein Thema nicht mit aphoristischen Bemerkungen oder dogmatischen Behauptungen abtun, sondern in den wichtigsten Punkten so behandeln, daß ich bezüglich Mikrochemie wohl allgemein Bekanntes, bezüglich Mikrophysik nur ganz elementare Kenntnisse voraussetze.

II.

Als Mikrochemie[1]) faßt man bekanntlich heute solche Methoden[1]) der chemischen Untersuchung zusammen, die gestatten, mit möglichst geringen Substanzmengen in kurzer Zeit qualitative und vielfach auch quantitative Analysen bzw. Bestimmungen der für den Chemiker wichtigen Stoffkonstanten mit einer Exaktheit auszuführen, die makrochemischen[2]) Methoden gleichkommt oder sie noch übertrifft. Schon wegen der erforderlich geringen Substanzmengen und dem Zeitgewinn können quantitative Analysen nach Mikromethoden leicht wiederholt und daher Fehlergrenzen besser erkannt werden. Auf die speziellen Forderungen, die sich bloß durch das Arbeiten mit kleinen Stoffmengen ergeben, angefangen von der Einwaage und der Wahl des Analysenganges, auf die speziellen Ansprüche an die notwendigen Apparaturen (in erster Linie die Leistungsfähigkeit von Waagen), auf die Arbeitsweise, Vorsichtsmaßregeln, die verschiedenen, oft unscheinbaren und doch entscheidend wichtigen Kunstgriffe usw. brauche ich nicht weiter einzugehen. Ebensowenig brauche ich hier an Beispielen einzeln die Vorteile aufzuzählen, die quantitativen mikrochemischen Arbeitsmethoden so schnell zur Anerkennung und Verbreitung verholfen haben.

---

[1]) Mikrochemie war natürlich stets als Methode gemeint und nicht als eigene „neue Wissenschaft“, wie in bewußter oder unbewußter Entstellung der Tatsachen man früher von Gegnern der Mikromethoden vielfach hörte. Beim derzeitigen Stand der Mikrochemie dürften ähnliche Bemerkungen kaum mehr beachtet werden.

[2]) Eine Abgrenzung zwischen mikrochemischen und makrochemischen Methoden bleibt natürlich immer willkürlich, obwohl im einzelnen eben vorliegenden Fall eine Entscheidung nicht schwer fallen dürfte.

Es ist klar, daß eine Arbeitsweise, welche den Prinzipien der Substanz-Zeit-Raumökonomie in so hohem Maße entspricht wie die Mikrochemie, nicht nur für den Chemiker oder Techniker wichtig ist, sondern noch mehr für den Biologen und Mediziner. Die Arbeitsbedingungen und die gegebene Ausgangssituation der Untersuchung sind ja für beide meistens so, daß überhaupt nur Mikromethoden angewendet werden können. — In typischen Fällen kommen für den Biologen und Mediziner zwei Möglichkeiten in Betracht, die jedoch verschiedene Ansprüche an die Art der Anwendung und die Grenzen der Auswertung von Mikromethoden stellen. Entweder stehen geringe, doch isolierbare Stoffmengen, besonders Flüssigkeiten (Blut, Serum, Plasma, Kammerwasser, Leibeshöhlenflüssigkeit, Verdauungssäfte, Exkretions- und Sekretionsprodukte, Preßsäfte usw.), für die Analyse zur Verfügung oder die mikrochemischen Analysen sollen direkt an strukturierten Organen und Geweben vorgenommen werden, letzten Endes an der Zelle als letzte, selbständig lebensfähige morphologische und physiologische Einheit. Für diesen zweiten Fall spielt nun eine Forderung eine entscheidend wichtige Rolle, die es bei einer rein chemischen qualitativen Mikroanalyse nicht gibt. Es ist die Notwendigkeit, kleinste Stoffmengen lokalisiert in Organen, Geweben, Zellen und oft auch Zellbestandteilen nachzuweisen. Auch diese Ansprüche sind in sehr vielen Fällen in einer durchaus befriedigenden Weise erfüllt, wenigstens insofern, als beim gegenwärtigen Stand der Biochemie bestimmte erfüllbare Forderungen überhaupt gestellt werden können. In vielen anderen Fällen aber stößt die mikrochemische lokalisierende Analyse tierischer und pflanzlicher Objekte auf unüberwindliche Hindernisse, die allerdings leicht verständlich sind. Man darf ja nicht übersehen, daß die nur chemische Analyse trotz aller Schwierigkeiten unter relativ einfachen Bedingungen ausgeführt werden kann, daß ein fallweise in Betracht kommender Stoff meistens isoliert und in reinem Zustand in reinen Lösungsmitteln gelöst, untersucht werden kann, daß unter diesen Bedingungen homogene Reaktionsräume vorliegen und daß unter den Gruppen- und Spezifitätsreaktionen fallweise jene gewählt werden können, die am günstigsten sind. Für den Biologen und Mediziner sind aber die Arbeitsbedingungen von Grund auf anders, und zwar so, daß sie ohne weitgehende Veränderung bzw. völlige Zerstörung des zu prüfenden Substrates nicht willkürlich beeinflußbar sind. Alle Reaktionen, welche im strukturierten[3]), an Kolloiden und Elektrolyten reichen Milieu der Zellen oder Körpersäfte vorgenommen werden müssen, erfolgen unter derart ungünstigen Reaktionsbedingungen, daß sonst sehr empfindliche und spezifische Proben überhaupt nicht anwendbar sind oder an Empfindlichkeit und Eindeutigkeit sehr viel einbüßen. Es ist deshalb verständlich, daß bei der lokalisierenden Mikroanalyse im Dienste der Morphologie und Physiologie besonders tierischer Objekte, viele Erfahrungen und Erfolge der qualitativen Mikroanalyse nicht ausgewertet werden können, so daß die Grenzen viel enger gezogen sind. Trotzdem kann man hoffen — und der stete Fortschritt berechtigt dazu —, daß bei konsequentem Arbeiten manche heute noch bestehende Schwierigkeit ausgeschaltet werden kann.

Ich möchte nun Ihre Aufmerksamkeit gleich auf eine, meiner Meinung nach, zu wenig beachtete Seite der lokalisierenden mikrochemischen Analyse lenken, die eine prinzipielle Bedeutung hat. Wenn der Chemiker eine Organ- oder Gewebeanalyse ausführt, so können die nachgewiesenen Stoffe einfach entweder auf Trockengewichte oder Aschesubstanz bezogen und in Gramm- oder Milligrammäquivalenten angegeben werden. An den Ergebnissen, sei es der qualitativen oder quantitativen Analyse, hat aber auch der Histologe oder Cytologe ein Interesse, und von seinem Standpunkt aus kann er mit Recht verlangen, daß die Analyse nicht bloß in bezug auf die grobe Anatomie gilt, sondern bis in mikroskopische Dimensionen von Zellen und Zellbestandteilen fortgeführt und kontrolliert werden kann. Die nachgewiesenen Stoffe sind eben niemals gleichmäßig diffus[4]) verteilt, sondern in typischer Weise lokalisiert. Es ist begreiflich, daß unter diesen Umständen Morphologie bzw. Histologie einerseits und Chemie anderseits in gleichem Maße berücksichtigt werden müssen und ich kann mir schwer vorstellen, daß ein Histologe ohne ausreichende chemische Kenntnis bei der Interpretation der Ergebnisse chemischer Reaktionen genügend kritisch[5]) vorgehen wird, oder ein Chemiker Reaktionen an verschiedenen, ihm im Feinbau nicht oder wenig bekannten Geweben und Zellen auch im Sinne der Histologie oder Cytologie richtig auswerten bzw. in oft wichtigen Einzelheiten immer zutreffend erkennen wird. Wir sehen sonach die Notwendigkeit, zumindest zwei Arbeitsgebiete, die sonst ganz getrennt und unabhängig voneinander vorgehen und sich entwickeln können, in ihren Ergebnissen, Folgerungen und Forderungen zur Deckung zu bringen. Wenn man unter Synthese in der Wissenschaft ganz allgemein die Zusammenfassung von sonst isolierten Beobachtungen, einzelnen Schlüssen usw. versteht, dann haben wir somit in jeder biologisch ausgewerteten Mikroanalyse auch einen ausgesprochen synthetischen Zug, der in einer Zeit unaufhaltsamer Spezialisierung nicht hoch genug eingeschätzt werden kann.

---

[3]) Ich kann hier auf die prinzipiell wichtigen Begriffe: Struktur, Skalar, Vektor, Gradient, Gestalt usw. nicht näher eingehen. Vgl. dazu Gicklhorn, Protoplasma, 2, 1927, Kap. IV.

[4]) Für einen Biologen ist es immer wieder überraschend, wie wenig Wert Biochemiker gerade auf lokalisierte Nachweise legen. Selbst dort, wo man eine gleichmäßig diffuse Stoffverteilung noch am ehesten annehmen könnte, nämlich im Blute von Warm- und Kaltblütern, ist auf Grund feiner lokalisierender Untersuchungen schon längst ein beträchtlicher Unterschied z. B. im Kohlensäure- oder Zuckergehalt der zu- oder abführenden Gefäße verschiedener Organe sichergestellt.

In aller Kürze möchte ich weiters die Gründe einer anscheinend ebenfalls wenig beachteten Situation in der angewandten Mikrochemie nennen. Es kann sich jeder leicht überzeugen, daß die Botanik sowohl an Zahl der Spezialarbeiten als auch an Reichtum der Erfolge an erster Stelle steht und demgegenüber die lokalisierende Mikroanalyse tierischer Zellen, Gewebe oder Organe geradezu rückständig erscheint. Es ist gewiß richtig, wenn man zur Erklärung dieser Tatsache darauf hinweist, daß die Untersuchungsmethoden an pflanzlichen Zellen einfacher sind, daß der zellige Bau hier übersichtlicher und klarer — man möchte fast sagen sauberer — ist und die Studienobjekte auch leichter zu beschaffen und zu behandeln sind. Aber mit diesem Hinweis allein kann man den Vorsprung der Botanik doch nicht ganz erklären. Zumindest ebenso wichtig halte ich die Tatsache, daß gerade die Botaniker sehr frühzeitig den Wert und die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten mikrochemischer Untersuchungsmethoden erkannt haben, daß ein enger Zusammenschluß zwischen Botanik und Chemie jahrzehntelang schon besteht, daß Botaniker immer mit Interesse den Ausbau und Fortschritt der analytischen Chemie verfolgt haben und ihrerseits den Chemikern wertvolle Vorarbeit geleistet haben. In der Botanik ist auch die Lebendbeobachtung niemals in dem Maße zurückgedrängt gewesen, wie in der Histologie oder Cytologie tierischer Versuchsobjekte. Erst in den letzten Jahren vollzieht sich ein Umschwung und der mikrochemischen Analyse tierischer Gewebe und Zellen wird heute in stets zunehmendem Maße Aufmerksamkeit gewidmet[6]).

---

[5]) Ein typisches Beispiel ist die Verwendung von $AgNO_3$ in der histologischen Technik. Man findet erstaunlich oft die Meinung, daß nach Einwirkung von $AgNO_3$ auftretende, im Mikroskop schwarz erscheinende feinkörnige Niederschläge Silberchlorid sein sollen, daher diese Reaktion als Chlornachweis auch dann beansprucht wird, wenn von einem solchen Nachweis keine Rede sein kann.

Die Bedeutung mikrochemischer Methoden speziell für die Medizin muß ich vor Medizinern nicht weiter erörtern; man braucht nur einige Bände medizinischer Fachzeitschriften daraufhin durchzusehen, sofern sie biochemische Arbeiten bringen. Mehr nebenher und um Bekanntes in Erinnerung zu rufen, erwähne ich bloß zwei Beispiele: die Mikrochemie im Dienste der so aktuellen Diabetesforschung und die Erfolge der Spurensuche. Auf die Bedeutung mikrochemischer Methoden im Dienste der Toxikologie, Lebensmittel- und Genußmitteluntersuchung, der Blut- und Harnanalyse usw., also eminent praktischer Probleme, kann ich gar nicht eingehen. Vielleicht wäre es übertrieben, wenn man heute behaupten würde, daß der ungeahnte rasche Fortschritt der Diabetesforschung — die Kenntnis des Insulins und seiner Wirkung vorausgesetzt — bloß durch Mikromethoden zur quantitativen Bestimmung des Blutzuckers möglich war. Sicher aber ist, daß erst durch sie ein schnelles, rationelles und dabei relativ einfaches Arbeiten ermöglicht wurde und nichts anderes könnte besser die besonderen Vorzüge der Mikrochemie beweisen, als wenn heute Mediziner Blutzuckeranalysen wieder so ausführen müßten, wie seinerzeit etwa CLAUDE BERNARD oder MINKOWSKI. Der außerordentliche Material- und Zeitgewinn, namentlich bei den unumgänglich notwendigen Serienuntersuchungen, wie er seit der BANG'schen Methode garantiert ist, hat ja diesen Methoden und ebenso darauffolgenden Verbesserungen „selbstverständlich" zur allgemeinen praktischen Auswertung verholfen. — Unter den Beispielen, welche den Wert der „Spurensuche" ins rechte Licht setzen können, erwähne ich nur die Frage nach der normalen oder pathologischen Ausscheidung von Quecksilber im Harn, Stuhl oder Speichel, eine Frage, die sehr lebhaft diskutiert wurde. Die aufsehenerregende Mitteilung von STOCK, daß Menschen mit Amalgamplomben dauernd Quecksilber ausscheiden, dürfte nach neuesten Untersuchungen[7]) dahin geklärt sein, daß Mengen um zirka 10 γ nicht pathologisch sind, sondern der normalen Ausscheidung jener Spuren von Quecksilber entsprechen, die wir täglich mit den Nahrungsmitteln — tierischen und pflanzlichen — aufnehmen.

---

[6]) Es trägt sicherlich mit dazu bei, daß man nun beginnt, auch die Ergebnisse mikrochemischer Analysen tierischer Organe zusammenzufassen, denn jene sind in so verschiedenen physiologischen, zoologischen und physiologisch-chemischen Zeitschriften niedergelegt, daß eine erste Orientierung sehr erschwert ist.

Ein allgemein wichtiger Erfolg mikrochemischer Untersuchungen in der Biologie und Medizin scheint mir schließlich darin zu liegen, daß mit dem Fortschreiten der Forschung ein Vorurteil allmählich abgebaut wurde, das lange Zeit herrschend war. Es ist die Meinung, daß jene Stoffe im Leben der Zelle besonders wichtig sein müssen, die in besonders großer Menge vorkommen. Ein spezielles Beispiel haben wir in den verschiedenen Hypothesen und Theorien über die dominierende Funktion der verschiedenen Eiweißkörper. Demgegenüber sollten andere organische und anorganische Stoffe, die in geringer Menge oder nur in Spuren nachweisbar sind, ihrem Vorkommen in Zellen, Geweben und Organen nach mehr zufällig, daher minder wichtig oder belanglos sein. Mikrochemische Untersuchungen haben aber das oft streng spezifisch lokalisierte und vor allem das konstante Vorkommen auch seltener oder vermeintlich minder wichtiger oder angeblich nicht notwendiger Elemente und Verbindungen nachweisen können, so daß auf diese Ergebnisse hin experimentell-physiologische Studien vielfach neue Anregungen erhielten und zu überraschenden Beobachtungen führten. (Beispiele: Lipoide, Jod usw.)

---

[7]) Siehe FR. SCHENK, Wiener med. Wochenschr., 81, 1931, H. 29. — In erster Linie sind hier die Arbeiten von PORINSKI zu nennen.

Diese knappen Ausführungen über Mikrochemie müssen genügen, denn mikrophysikalische Probleme und Methoden sollen nun eingehender besprochen werden.

III.

Zur Charakteristik der Mikrophysik können wir mit geringer sinngemäßer Variation die gleichen Kriterien verwenden, die bezüglich Mikrochemie erwähnt wurden.

Wir werden daher ganz allgemein und zur ersten Orientierung ausreichend als mikrophysikalische Methoden solche bezeichnen, mit welchen man entweder an möglichst geringen Substanzmengen oder in möglichst kleinen Räumen rasch und leicht solche Vorgänge, Zustände und Kräfte nachweisen und auch ausreichend[8]) genau messen kann, die eben Gegenstand der physikalischen Betrachtungsweise sind. Bei dieser Fassung dürfte es kaum zur Verwechslung mit einem anderen, längst eingebürgerten und heute besonders oft verwendeten Begriff kommen, nämlich dem der „Molekularphysik“. Ebensowenig als der Mikrochemiker spezielle Atom- oder Molekülchemie betreiben will, ebensowenig ist die Mikrophysik auf das Studium der letzten Masseteilchen jeder Materie, also der Moleküle, Atome, Ionen und Elektronen gerichtet. Man wird vielmehr bedenken müssen, daß „für ein bestimmtes Gebiet (z. B. die Physiologie) vieles bereits Voraussetzung und Postulat sein muß, das für sich allein genommen, in anderen Gebieten (z. B. der Physik) Problem ist. Daher ist es weder notwendig noch zulässig oder möglich, die Physiologie auf eine Atom- oder Molekularphysik zu reduzieren[9]) und physiologische Aussagen von den jeweiligen Fortschritten des Wissens von dem Feinbau der Materie abhängig zu machen. Es ist ferner eine durchaus eigene Sache, die jeweils verwendeten Begriffe auf ihre logischen und philosophischen Grundlagen hin zu prüfen. In praxi kann es sich immer nur darum handeln, einmal eingeführte und verwendete Begriffe zu präzisieren und sie dann auch immer im gleichen Sinn anzuwenden." (Gicklhorn, Protoplasma, 2. Bd., Anmerkung Nr. 39, S. 123.)

---

[8]) Damit soll ausgedrückt werden, daß Präzisionsmessungen im Sinne physikalischer Meßtechnik wohl nur in Ausnahmsfällen angestrebt werden. Die erforderliche Genauigkeit irgendeiner Messung hängt nicht nur von der Methode selbst ab, sondern soll auch sinngemäß dem fallweise vorliegenden Problem angepaßt sein. Ein oft vorkommender Fehler in biologischen Arbeiten besteht darin, daß eine vermeintlich besonders große Genauigkeit der Endresultate einfach durch Rechenoperationen mit möglichst vielen Dezimalen erreicht werden kann. Ein solches Vorgehen zeigt von wenig Verständnis für die Methode und ist nur eine Selbsttäuschung über die mögliche Genauigkeit von Messungen.

Das wichtigste Hilfsinstrument der biologisch und medizinisch auswertbaren Mikrophysik ist natürlich ebenso wie in der Mikrochemie das Mikroskop. Jene Räume und Massen, welche zur mikrophysikalischen Untersuchung vorliegen, sind ihrer Größe nach meistens von mikroskopischen Dimensionen, das ist zirka 10^{-2} bis 10^{-4} cm, fallen daher für eine molekular-theoretische Betrachtung. der Molekül- und Atomdimensionen zugrundeliegen (das ist 10^{-8} cm), noch unter den Begriff „Makrophysik", wenn es sich auch in unseren Fällen um ein wichtiges Übergangsgebiet handelt.

Probleme der Mikrophysik scheinen auf den ersten Blick ungleich einfacher und leichter lösbar als die der Mikrochemie. Man könnte zum Beispiel meinen, daß durch die mikrochemische Analyse viele Tausend chemisch definierter Verbindungen — abgesehen von den bekannten Elementen — durch Gruppenreaktionen und eindeutige, genügend empfindliche Spezifitätsproben nachzuweisen sind, während die Zahl der physikalischen Kräfte oder Vorgänge demgegenüber außerordentlich gering ist. Eine solche Meinung würde sich auf einen Vergleich mit der qualitativen chemischen Analyse beschränken, während für die quantitative organische und anorganische Mikroanalyse offensichtlich ähnliche Verhältnisse wie bei einer physikalischen Untersuchung vorliegen, daher auch die Zahl der notwendigen Methoden und Reaktionen nicht allzu groß ist.

---

[9]) Der Übergang von makroskopischen über mikroskopische zu ultramikroskopischen bis atomaren Dimensionen ist natürlich stetig; die Verwendung von Begriffen, welche für makroskopische Systeme geprägt wurden und nur für diese Sinn haben, muß aber mit entsprechender Vorsicht erfolgen. Eine ganze Anzahl von Eigenschaften kennen wir natürlich nur für makroskopische Systeme, da z. B. das einzelne Atom, Molekül, Mizell keine Viskosität oder Oberflächenspannung usw. besitzt. Es ist sicher unzulässig, wenn man z. B. Physiologie in eine Atomphysik auflösen wollte und jeder solche Versuch zeigt nur, wie willkürlich dann Grundlagen und Grenzen definitionsgemäß bestimmter Disziplinen beliebig erweitert oder eingeschränkt werden.

In unserem Fall besteht das Ziel vornehmlich darin, bestimmte Vorgänge, Zustände und Kräfte an einem gegebenen „System" oder „Substrat" in einem bestimmten Zeitpunkt für sich und namentlich in den Veränderungen messen, zumindest der Größenordnung nach zutreffend schätzen zu können. Das Hauptinteresse des Biologen konzentriert sich aber weniger auf eine wiederholte Bestimmung bei stets gleichen Bedingungen als vielmehr auf die autonomen oder experimentell ausgelösten Veränderungen, wenn ein lebendes, organisiertes Versuchsobjekt oder irgendein organisches Medium (Körpersäfte, Exkrete, Sekrete usw.) zur Untersuchung vorliegt. Es kommt deshalb nicht so sehr auf spezielle Ergebnisse, sondern auf geeignete Methoden[10]) an, die für jeden beliebigen überhaupt in Betracht kommenden Fall anwendbar sein sollen. —

Alle für den Biologen wichtigen physikalischen Erscheinungen können natürlich nur in bezug auf ein gegebenes System oder für bestimmte Bedingungen studiert werden, für die die wirksamen Kräfte nach Größe und Richtung einen fallweise[11]) bestimmten Wert haben. Man kann nicht mit einzelnen Kräften oder Vorgängen, losgelöst von allen übrigen mitbestimmenden Systembedingungen experimentieren, sondern wendet nur die Aufmerksamkeit einer speziellen Erscheinung zu, z. B. der Oberflächenspannung, der Viskosität, den elektrischen Eigenschaften, den Dispersitätsverhältnissen, dem optischen Verhalten usw. In praxi bleiben alle übrigen, einen gegebenen Zustand ebenso charakterisierenden Faktoren gleichzeitig ebenso wirksam wie der eine Faktor, den man studiert, und es ist schlechthin unzulässig, alle anderen, für eine spezielle Untersuchung nicht eigens beachteten Faktoren einfach als nicht existierend hinzustellen. Diese nachdrückliche Betonung könnte selbstverständlich, sogar überflüssig erscheinen. In den Auswirkungen aber führt gerade die Nichtbeachtung dieser Sachlage zu wenig erfreulichen Folgen, denn sie ist der wichtigste Grund, daß viele bei der Hypothesen- und Theorienbildung in biologischen Disziplinen zu Einseitigkeiten und schematisierender Behandlung der Probleme verleitet werden, die uns der lebende Organismus leider nicht in derart abstrahierender Einfachheit bietet, als fallweise Lösungsversuche vorgeben.

---

[10]) Darauf wird viel zu wenig Gewicht gelegt. Sobald man irgendeine Frage experimentell behandelt, reichen bloße Beschreibungen — und wenn sie noch so genau und sorgfältig sind — nicht mehr aus. Der Wert und die Bedeutung von Ergebnissen wird letzten Endes doch von einer klaren eindeutigen Fragestellung, den Fehlerquellen und Grenzen der verwendeten Methoden abhängen, mit welchen die Ergebnisse gewonnen wurden.

[11]) Die üblicherweise als „Konstanten" bezeichneten Größen sind natürlich nicht auch zahlenmäßig konstante Werte, so wenig Absolutwerte solche im Sinne der Logik oder Philosophie sind. Ein „absoluter" Wert im Sinne der Physik heißt nichts anderes, als daß er auf ein willkürlich festgelegtes Einheitssystem bezogen ist, das heißt Cm-Gr-Sek.-System.

Bei einem Vergleich zwischen mikrochemischen und mikrophysikalischen Methoden fällt weiters auf, daß die letzteren viel mehr von bestimmten einschränkenden Bedingungen abhängen, daß vor allem die Zulässigkeit oder Nichtzulässigkeit bestimmter Voraussetzungen für die rechnerische Auswertung sich viel stärker geltend macht und daß die Fehlerquellen einer speziellen Versuchsanordnung oder Meßmethode, durch welche das zu untersuchende System natürlich möglichst wenig verändert werden darf, eine entscheidend wichtige Rolle spielen. Ich erinnere auch daran, daß für die Berechnungen vielfach Daten notwendig sind, z. B. Dichte, Viskosität usw., die selten eigens mit genauen Methoden an dem gerade zur Untersuchung vorliegenden System bestimmt werden, sondern oft bei willkürlicher Korrektur aus anderen Untersuchungen übernommen werden, die unter anderen Bedingungen und in anderer Absicht ausgeführt wurden. Für den Biologen ist dieses naheliegende Vorgehen nicht unbedenklich, weil dadurch solche Fehlerquellen entstehen können, die nur willkürlich geschätzt, meist aber gar nicht in ihrer wahren Größe erkannt werden können. — Es wären noch viele Umstände aufzuzählen, welche alle nur zeigen, daß die Voraussetzungen und Arbeitsbedingungen für die Mikrophysik sich von denen der Mikrochemie beträchtlich unterscheiden. Die besonderen Seiten mikrophysikalischer Arbeitsweise sollen jedoch an ausgewählten Beispielen behandelt werden.

Ich will vorher noch kurz auf die Bedingungen eingehen, unter welchen heute der Ausbau einer Mikrophysik in der Biologie und

Medizin vor sich geht. Es sind zwar in der Entwicklung, also historisch bedingte, doch mehr zufällige äußere Umstände, die, meiner Meinung nach, einen ungleich größeren Einfluß haben als sachliche Schwierigkeiten, die aber nicht unterschätzt werden dürfen. Stellen wir einmal die sich auf den gegenwärtigen Stand der Mikrochemie und der Mikrophysik beziehenden Einflüsse gegenüber, dann haben wir ungefähr folgende Situationen:

Schon aus dem Lehrplan unserer Hochschulen ist ersichtlich, daß für den Biologen und Mediziner die Anforderungen und Möglichkeiten zur theoretischen und praktischen Ausbildung in der Chemie ungleich größer sind als in der Physik. Es ist begreiflich, daß unter diesen Umständen die Vorschulung in chemischen Disziplinen, soweit sie der Biologe und Mediziner unmittelbar benötigt und beherrschen muß, gründlicher ist und nachhaltiger wirkt. Es sind demgegenüber nachweisbar nur wenige, die aus eigener Initiative als Vorstudium für biologisches Arbeiten die Physik[12]) wählen oder darauf verwiesen werden.

Die ideelle Zusammenarbeit von Chemikern und Biologen, noch mehr zwischen Chemikern und Medizinern, ist längst gesichert und es sind wohl jedem auch Beispiele dafür bekannt, wie oft ein persönliches Zusammenarbeiten am gleichen Problem sogar im gleichen Laboratorium erfolgt. Ebenso werden die Ergebnisse bzw. Beobachtungen des einen Gebietes mit großem Interesse im anderen verfolgt oder fortgeführt. Ähnliches ist in der Biophysik heute noch seltene Ausnahme.

Biologen und Mediziner, die sich für mikrochemische Methoden interessieren und sie anwenden wollen, finden in der überwiegenden

---

[12]) „Meist verweist man auf die weniger häufige Begabung für Mathematik und Physik. Dazu ist zu sagen: Für den Biologen handelt es sich nicht um ein mit Fachphysikern oder Mathematikern konkurrierendes umfassendes Wissen, sondern um Kenntnis von Methoden und Möglichkeiten zur Auswertung, um Verständnis für die Grundlagen, den Sinn und die Tragweite von physikalischen Gesetzen und um Empfänglichkeit für die Denkweise physikalischer Disziplinen. Der Biologe soll dadurch imstande sein, für seine Probleme die jeweils in Betracht kommenden Methoden der Physik unter sinngemäßer Anpassung und mit erforderlicher Kritik für die gerade gegebenen Verhältnisse heranziehen zu können.“ (GICKLHORN, Protoplasma, *2*, 1927, Fußnote Nr. 14.)

Mehrzahl der Fälle die wichtigste Vorarbeit bereits geleistet, so daß sie unmittelbar spezielle Probleme behandeln können. In physikalischen Fragen ist es demgegenüber in der Regel gerade der Mangel an Vorarbeiten — denen jeder gerne aus dem Wege gehen will —, der viele von sicher aussichtsreichen Arbeiten mit Methoden der Mikrophysik abhält.

Jede biochemische, mit Mikromethoden ausgeführte Arbeit findet heute die ihr gebührende Beachtung, Ergebnisse können mit anderen anderer Autoren verglichen und unter jene eingegliedert werden. Demgegenüber werden Fortschritte oder Irrtümer in mikrophysikalischen Arbeiten zu verschiedenen biologischen Fragen ungleich weniger beachtet und vielfach herrscht die Ansicht, daß Arbeiten in dieser Richtung schließlich nur den Sonderinteressen einer kleinen Gruppe von Biologen oder Medizinern dienen.

Die ungeahnten Erfolge der Mikrochemie sind für viele Grund genug, in der gleichen Richtung weiterzuarbeiten und die berechtigte Hoffnung auf immer neue Erfolge ist ein ganz allgemein verbreitetes Motiv. Bezüglich der Mikrophysik scheinen nur wenige der Überzeugung, daß hier überhaupt ein eigenes und fruchtbares Arbeitsfeld vorliegt. Jeder Biologe oder Mediziner, der sich in mikrochemische Methoden einarbeiten will, hat genug Gelegenheiten und Möglichkeiten dazu, während er bei besonderem Interesse für die Mikrophysik bald auf unerwartete Hindernisse stößt oder unsicher wird. Es ist ein Ausnahmsfall, wenn ihm dann zufällig Gelegenheit geboten ist, mit einem Fachphysiker zusammenarbeiten zu können und dieser für die speziellen Objekte, Schwierigkeiten und Fragen des Biologen auch das nötige Verständnis zeigt. Meist aber haben Fachphysiker von der Eigenart biologischer Objekte und Vorgänge eine für den Biologen geradezu aufreizende Vorstellung, die entweder in einer extrem schematisierenden und vereinfachenden Tendenz besteht oder die sich mit Prinzipien von so allgemeiner Fassung und Gültigkeit begnügt, daß damit für das Studium eines eben vorliegenden Falles nichts gewonnen ist.

Welcher Wertschätzung[13]) sich heute die Mikrochemie erfreut, zeigt die bereits umfangreiche Spezialliteratur, die in einer schon beträchtlichen Anzahl zusammenfassender Werke behandelt ist. Ich kann weiter darauf hinweisen, daß eine eigene Zeitschrift den Interessen der Mikrochemie dient und gerade an diesem Fall möchte ich auf eine Kleinigkeit hinweisen, die aber symptomatisch ist. Während diese Zeitschrift nämlich ursprünglich unter dem Titel: „Mikrochemie“ (Zeitschrift für das Gesamtgebiet der Mikrochemie und Mikrophysik) ab 1923 erschien — ein Titel, der durchaus sinngemäß ist —, wurde vor einigen Jahren eine notwendige Änderung des Untertitels in: Mikrochemie, Zeitschrift für deren Gesamtgebiet, vorgenommen, da typisch mikrophysikalische Arbeiten ausblieben.

---

[13]) Ich erinnere auch daran, daß in der Versammlung der deutschen Chemiker in Wien 1931 die Mikrochemie Gegenstand von Hauptreferaten in allgemeinen Sitzungen war.

Ich glaube, daß ich nicht noch weitere Punkte einzeln aufzählen und diskutieren muß, um sagen zu können, daß es derzeit im Ausbau der Mikrophysik genug Hemmungen gibt, während für die Mikrochemie längst ein kontinuierlicher Fortschritt gesichert ist. Trotzdem zeigen die bereits vorliegenden Methoden und Erfolge, daß die Möglichkeit besteht, zu einer allgemein anwendbaren Mikrophysik zu gelangen. „Soll aber die Mikrophysik in absehbarer Zeit annähernd die Stufe der Mikrochemie von heute erreichen, so wird das kaum anders und kaum ökonomischer für den einzelnen und die Sache gelingen, als durch ein immer wieder betontes Zusammenarbeiten zwischen Biologie und Physik. Der erste Schritt dazu muß von seiten der Biologen unternommen werden, und an ihnen liegt es, nicht nur Anschluß und Rat bei Physikern von Fach zu suchen und sich in diesem Gebiete vorzuschulen, sondern mehr als bisher Methoden und Ergebnisse der Physik heranzuziehen.“ (Gicklhorn, Protoplasma, 2. Bd., S. 113—114.) Ich halte es aber nicht für überflüssig, dazu folgendes zu bemerken:

Bei dieser Zusammenarbeit wird nicht der Physiker, sondern der Biologe die Führung behalten müssen. Seine Aufgabe besteht darin, unter Hinweis auf die besonderen Arbeitsbedingungen und die gegenüber einer physikalischen Arbeit ganz anders gearteten Ziele und Grenzen jeder biologisch auswertbaren Studie jene Forderungen klarzustellen, welchen eine bestimmte Methode entsprechen muß und die auch für den Physiker oft genug neue Aufgaben bedeuten. Erfahrungsgemäß genügt es nicht, bisher übliche Methoden der Experimentalphysik einfach zu übernehmen, also in kleinem Maßstab hergestellte Apparate bzw. nicht wesentlich modifizierte Versuchsanordnungen verwenden zu wollen. Die Gründe unausbleiblicher Fehlschläge bei solchen Versuchen können hier nicht weiter berücksichtigt werden.

Es sollte immer danach gestrebt werden, zum Studium irgendeiner bestimmten, den Biologen oder Mediziner interessierenden Erscheinung stets mehrere Methoden auszuarbeiten, die in ihren theoretischen Grundlagen voneinander unabhängig sind und deren Voraussetzungen für die Berechnung der Endresultate möglichst verschieden sind. Nicht nur in zweifelhaften Fällen oder bei völlig unerwarteten Versuchsergebnissen wird die Sicherheit der Aussage dadurch gewinnen, wenn verschiedene Methoden angewendet und die Ergebnisse verglichen werden können.

Es muß weiter ständig beachtet werden, daß physikalische Untersuchungen weder für den Biologen noch den Mediziner Selbstzweck sind; angewendete Methoden sind daher nur Hilfsmethoden neben anderen, welche durchaus gleichwertig und gleichberechtigt sind. Spezielles persönliches Interesse oder Modeströmungen, welche bestimmte Methoden zeitweise aktuell und begehrt machen, können daran nichts ändern.

IV.

Wenn ich nun auf einzelne mikrophysikalische Methoden ausführlicher eingehe, so bedarf es wohl keiner weiteren Begründung, wenn ich mich hier auf die Darstellung der Prinzipien und speziellen Züge willkürlich gewählter Beispiele beschränke. Ich muß deshalb ausdrücklich betonen, daß die Zahl der biologisch auswertbaren Mikromethoden größer ist als man oft anzunehmen scheint*), daß auch die Leistungsfähigkeit vielfach schon ausreichend ist und daß sich heute die wichtigsten mechanischen, elektrischen, optischen und thermischen Erscheinungen — soweit sie für experimentell-biologische Arbeiten in Betracht kommen — mit hinreichender Genauigkeit untersuchen lassen. Für spezielle Forderungen stehen auch einzelne Spezialmethoden zur Verfügung.

Ich beginne mit dem relativ einfachsten Fall, das ist die Bestimmung der Dichte bzw. des spezifischen

---

*) Siehe Fußnote 43.

Gewichtes, wobei ich gleich hervorheben kann, daß solche Untersuchungen von Biologen und Medizinern ganz zu Unrecht wenig beachtet werden. Die Kenntnis der Dichte ist bei biochemischen und biologischen Untersuchungen nicht nur oft erwünscht, sondern dann unbedingt notwendig, wenn der fallweise bestimmte Wert zu Berechnungen, z. B. der Oberflächenspannung, der Viskosität, verschiedener optischer Konstanten usw. gefordert wird. Die Zahl der Methoden, die heute zur Dichtebestimmung zur Verfügung stehen, ist ganz beträchtlich und umfaßt solche, welche zur einfachen und schnellen Bestimmung von geringer Genauigkeit dienen bis zu Spezialmethoden zwecks Präzisionsmessungen von einer Genauigkeit in der 6. oder auch 7. Dezimale. Für den Biologen, der in der Regel sich weder mit einer Bestimmung auf 2 Dezimalen genau begnügen darf, noch nach einer Präzisionsmessung verlangt, kommt in erster Linie die pyknometrische Methode in Betracht, deren Genauigkeit durch die Verwendung von Mikrowaagen und Mikropipetten natürlich so gehalten werden kann, daß man damit in jedem, dieser Methode überhaupt zugänglichen Fall das Auslangen findet.

Oft werden aber Serienversuche verlangt, die möglichst einfach mit möglichst wenig Substanz in kurzer Zeit bequem, sicher und ausreichend genau ausgeführt werden können. Diesen Forderungen genügt z. B. eine Mikromethode nach folgendem Prinzip[14]):

Zwei miteinander mischbare oder nicht mischbare Flüssigkeiten bzw. Lösungen von verschiedenem spezifischen Gewicht lassen sich — Temperaturausgleich vorausgesetzt — bekanntlich nur dann mit stabiler horizontaler Grenze überschichten, wenn die Flüssigkeit mit dem größeren spezifischen Gewicht sich unten befindet. Bei entgegengesetzter Lage kommt es sofort zu einer Umschichtung oder Durchmischung unter mehr oder minder schneller und lebhafter Bildung von Wirbeln oder Schlieren. Je größer die Unterschiede der Dichte sind, desto ausgeprägter ist in einem Fall die Stabilität, im anderen die Labilität der Grenzschichte. Es ist leicht einzusehen, daß bei gleicher oder fast gleicher Dichte der beiden Flüssigkeiten deren Grenzschichte bei beliebiger Lagerung praktisch stabil ist, wenn Konvektionsströmungen oder Erschütterungen ausgeschlossen werden. In diesem Fall genügt natürlich die Kenntnis des spezifischen Gewichtes einer der Lösungen. Für diese Methode ist also charakteristisch, daß die Trennungsschichte überschichteter Medien als gewichtsloser, dabei veränderlicher „Schwebekörper" genommen wird und damit ein sehr empfindliches Kriterium für die Verschiedenheit oder Gleichheit der spezifischen Gewichte irgendwelcher überschichteter Lösungen vorliegt.

---

[14]) Gicklhorn, J., und Nistler, A., Protoplasma, 7, 1929.

Bei der praktischen Durchführung wird die Überschichtung in einer mit einfachsten Mitteln leicht herstellbaren Mikrokammer, z. B. von der in Fig. 1 gezeigten Form, vorgenommen. Diese Mikrokammer ist durch einen in einem feinen Spalt beweglichen dicht schließenden Schieber in zwei Hälften unterteilbar, in welche die zu prüfenden Medien gebracht werden. Bei entsprechenden Maßen ist es auch ermöglicht, die Kammer ohne Ausfließen oder Verlagern der überschichteten Lösungen umgekehrt zu halten, so daß bei einmaliger Füllung Probe und Gegenprobe ausgeführt werden kann. Als Vergleichsflüssigkeit können zum Beispiel verschiedenprozentige Zuckerlösungen verwendet werden, die Vorteile bieten, von welchen nur zwei genannt seien: es gibt wenig andere Stoffe, deren Lösungen in bezug auf spezifische Gewichte schon so oft und so genau mit genauen Methoden für verschiedene Temperaturen bestimmt wurden;

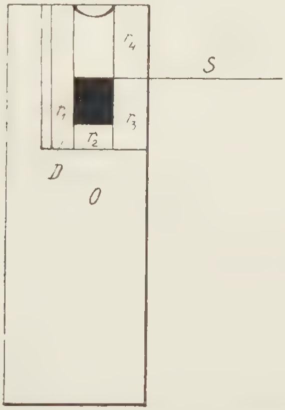


Fig. 1. Mikrokammer zur Dichtebestimmung nach der Überschichtungsprobe. O = Objektträger, D = Deckglas, r_1 bis r_4 = Glasstücke aus einem Objektträger zurechtgeschnitten und geschliffen, S = Schieber aus Zelluloid.

dazu kommt, daß die Löslichkeit eine derartige Spannweite der spezifischen Gewichte garantiert, daß damit die biologisch wichtigsten Flüssigkeiten (Serum, Exkrete, Sekrete usw.) erfaßt werden können.

Bezüglich des Verhaltens der Überschichtungszone als Kriterium für die Gleichheit der spezifischen Gewichte sei kurz erwähnt, daß es weniger auf das charakteristische Aussehen der Grenzschichte in einem Versuch ankommt, sondern daß das nicht mehr sicher zu unterscheidende Verhalten zu beachten ist, wenn die Vergleichslösung von bekanntem spezifischen Gewicht sich einmal unten, dann oben befindet. Ein spezieller Versuch kann besser als breite Ausführungen eine Bestimmung demonstrieren:

Gegeben ist Rinderserum; Temperatur 17,5° C. Das spezifische Gewicht wird durch Überschichten mit Zuckerlösungen bestimmt, wobei zunächst eine beliebige Konzentration gewählt wird, daraufhin eine andere sicher größere bzw. kleinere in ihrem Verhalten verglichen wird und durch Einengen der Werte schließlich der zutreffende gefunden wird. Es ergibt sich in einem speziellen Fall:

1. Versuch: Serum unten. 8% Zuckerlösung oben: sofort Umschichtung
Serum oben. 8% Zuckerlösung unten: stabile Zone.

2. Versuch: Serum unten. 7% Zuckerlösung oben: stabil.
Serum oben: 7% Zuckerlösung unten: sofort Umschichtung.

Daher ist die Dichte von 7% bzw. 8% Zuckerlösung sicher Grenzwert.

3. Versuch: Serum unten. 7,5% Zuckerlösung oben: Umschichtung.
Serum oben. 7,5% Zuckerlösung unten: stabil.

Daher liegt der gesuchte Wert sicher unter 7,5% Zuckerlösung.

4. Versuch: Serum unten. 7,2% Zuckerlösung oben: sehr langsam veränderliche, jedoch lagebeständige Trennungsschichte.
Der Gegenversuch ergibt das gleiche Verhalten.

Unter Hinweis auf die Daten in der Tabelle (Landoldt-Börnstein) und bei Beachtung der Temperaturkorrektur ist das gesuchte spezifische Gewicht des vorliegenden Serums sonach:

$$1{,}0277_7 + 0{,}0001_1 = \mathit{1{,}0285_8}.$$

Eine solche Bestimmung, die in 5—7 Minuten erledigt ist, verlangt bei entsprechend dimensionierter Kammer zirka 0,8 cm³ des zu prüfenden Mediums, wobei eine Genauigkeit noch in der 4. Dezimale erzielt werden kann. Es lassen sich nämlich Unterschiede der Zuckerlösungen um 0,1% noch sicher feststellen, was einem Unterschied im spezifischen Gewicht von 0,0004 entspricht.

Wenn noch geringere Flüssigkeitsmengen als zirka 0,8 cm³ vorliegen, dann modifiziert man die „Überschichtungsprobe“ so, daß man Teilproben in mehrere, etwa 1—2 cm lange Kapillaren von 0,5—1 mm innerem Durchmesser aufsaugt und in Medien bekannter Dichte bringt[15]). In diesem Falle wird das Eintreten oder Ausbleiben des Ausfließens des in den Kapillaren befindlichen Mediums beobachtet bzw. in orientierenden Versuchen auf die Geschwindigkeit des Ausfließens aus den lotrecht gehaltenen Kapillaren geachtet. Durch Verwendung verschiedener Vergleichslösungen werden die Grenzwerte systematisch immer enger gezogen, bis eben Gleichheit der spezifischen Gewichte festgestellt ist. Mit $NaCl$-Lösungen verschiedener Konzentration sind Differenzen, die sich um 0,01% bewegen, noch leicht zu erkennen, was einer Änderung des spezifischen Gewichtes um 7 Einheiten der 5. Dezimale entspricht.

Wenn aber noch weniger von der zu prüfenden Flüssigkeit vorliegt, also etwa 50—80 mm³, so kann man die Dichtebestimmung auf Grund folgender Beobachtung[16]) ausführen: Hält man eine zum Beispiel mit Serum gefüllte Kapillare lotrecht z. B. in dest. H_2O oder in eine 3%ige Zuckerlösung, dann erfolgt die Umschichtung so, daß H_2O oder die Zuckerlösung zentral in der Kapillare mit scharf abgegrenztem Meniskus aufsteigt, während das Serum an der Peripherie nach abwärts fließt (Fig. 2). Auch in diesem Fall ist natürlich die Geschwindigkeit des Aufsteigens der Vergleichslösung, gemessen an dem Weg (z. B. 1 cm) von dem Unterschied im spezifischen Gewicht der beiden Medien abhängig. Die Reibung zwischen den in entgegengesetzter Richtung während der Umschichtung fließenden Medien, ebenso ihre verschiedene Oberflächentensionen — die als Fehlerquellen in Betracht gezogen werden müßten — spielen in den meisten Fällen nachweisbar keine ausschlaggebende Rolle. Wenn man nun für eine Kapillare von gegebenem Durchmesser, z. B. für Zuckerlösungen verschiedener Konzentration, die Zeiten der erforderlichen Umschichtung bei gleichem Weg (z. B. 1 cm) vorher festgestellt und zusammen mit den zugehörigen Werten der spezifischen Gewichte in ein Koordinatensystem eingezeichnet hat, so erhält man eine Anzahl Kurven, an welchen man das spezifische Gewicht der zu prüfenden Lösung auf Grund gleicher Ausfließgeschwindigkeit gegen eine Zuckerlösung bekannter Konzentration ablesen kann. — Bei dieser Modifikation der Überschichtungsprobe genügen 2—3 Versuche, um Bestimmungen mit fast der früher erwähnten Genauigkeit ausführen zu können. Für die meisten biologischen Versuche ist gerade die Genauigkeit auf 4 Dezimalen bei Beachtung der Temperaturkorrektur erwünscht und völlig ausreichend.

---

[15]) Collander, R., Protoplasma, *8*, 1930.

[16]) Nicht veröffentlichte Untersuchungen, über die ich später ausführlicher berichte.

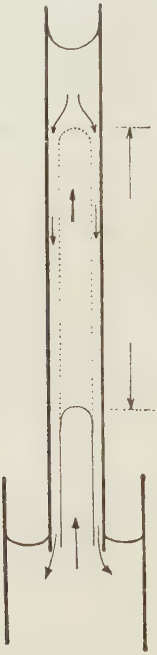


Fig. 2. Schema der Umschichtung zwischen Lösungen von verschiedenem spezifischen Gewicht in einer Kapillare.

Die Überschichtungsprobe gestattet aber auch, die Dichte isolierter zellulärer Elemente oder mikroskopisch kleiner Körper von beliebiger Form zur ersten Orientierung ausreichend so bestimmen zu können, daß man zwei indifferente Medien von verschiedenen spezifischen Gewichten mit stabiler Überschichtungsgrenze überlagert (Zucker — H_2O) und den zu prüfenden Körper bei Beobachtung mit schwacher Mikroskopvergrößerung frei fallen läßt. Ist das spezifische Gewicht des „Probekörpers" größer als das von der in der Mikrokammer sich unten befindlichen (Zucker-)Lösung bekannter Konzentration, daher auch Dichte, so wird er die Trennungszone durchbrechen. Im entgegengesetzten Falle wird der zu prüfende feste Körper in der Grenzschichte schweben bleiben und es bedarf bloß einiger einengender Versuche, um jene Konzentration zu erkennen, bei welcher er sich nur eben merkbar durch die Grenzschichte bewegt. Es ist klar, daß man bei dieser Mikromethode keine einschränkenden Bedingungen bezüglich der Form des Körpers — sofern er nur mikroskopisch klein ist — oder der Geschwindigkeit seines Fallens hat, wie sie für Bestimmungen mit Hilfe des STOKES'schen Gesetzes gefordert werden, die allerdings — entsprechende Versuchsobjekte und Versuchsanordnung vorausgesetzt — genauere Resultate liefern[17]). Daß aber auch die erwähnte Methode sehr befriedigende Werte liefert, wurde z. B. an einzelnen Hefezellen gezeigt.

An einem Beispiel möchte ich nun darauf aufmerksam machen, daß selbst so einfache Mikromethoden zu Beobachtungen führen, die über den speziellen Zweck einer Dichtebestimmung hinaus Interesse von Biologen und Medizinern verdienen. Es überrascht sicher nicht, daß das spezifische Gewicht einer wässerigen Methylenblaulösung größer ist als das des reinen Lösungsmittels, nämlich Wasser der gleichen Temperatur. Die Überschichtungsprobe fällt auch ganz nach Erwarten aus. Wenn man aber z. B. Methylenblau, Methylviolett usw. in Serum löst und das gefärbte Serum mit reinem überschichtet, so tritt eine Umlagerung ein[18]). Mit Methylenblau gefärbtes Serum ist also leichter geworden, und zwar im Verhältnis 1,0285 : 1,0257, was einem Unterschied der spezifischen Gewichte von etwa 0,7% Zuckerlösung entspricht. Diese Beobachtung kann man am einfachsten wohl so deuten, daß der Farbstoff an bestimmte Serumanteile gebunden wird — ob Albumine, Globuline oder Euglobuline, bleibt eine offene Frage — und daß bei der Entstehung von (Adsorptions-)Verbindungen Hydrationswasser frei wird, die Lösung sich somit so verhält, als ob sie verdünnt worden wäre. Diese plausible Deutung scheint mir deshalb bemerkenswert, weil dieselben Verhältnisse, welche beobachtet werden, wenn man nach Injektion von Farbstoffen in die Blutbahn eines Warmblüters Bestimmungen des spezifischen Gewichtes von so gefärbtem Serum vornimmt, keinesfalls der Hauptsache nach durch Permeabilitätsänderungen bedingt sein können. Es wurde nämlich zur Erklärung dieser Befunde die Meinung[19]) zur Diskussion gestellt, daß der injizierte Farbstoff besonders an den Kapillaren eine vorübergehende Permeabilitätsänderung bewirkt, daß deshalb Wasser aus den Geweben in die Blutbahn ausgeschüttet wird und dadurch die Änderung des spezifischen Gewichtes zustande kommen soll. Durch den Nachweis aber, daß eine gleichsinnige Änderung des spezifischen Gewichtes von Serum in gleichem Ausmaß auch in vitro eintritt, ist schon gezeigt, daß Permeabilitätsprobleme nicht unmittelbar in Frage kommen können.

---

[17]) LEONTJEW, H., Arch. Physiol., *209*, 1925, auch *213*, 1926, und Biochem. Ztschr., *170*, 1926.

[18]) Die ersten Beobachtungen an gefärbtem Serum wurden gelegentlich von Untersuchungen zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten gemacht (siehe S. 664). Da nicht gleich Dichteänderungen als entscheidende Ursache erkannt wurden, wurde zunächst ein Fehler im Bau oder der Handhabung der hier beschriebenen Mikrokammer vermutet.

Bestimmungen des spezifischen Gewichtes, denen man heute meist wenig Aufmerksamkeit zuwendet, führen sonach zu Beobachtungen, welche beim Studium der Eigenschaften und Veränderungen gelöster Stoffe noch manchen Aufschluß namentlich bei kolloiden Medien erwarten lassen, besonders im Hinblick auf Adsorptionsverbindungen und Hydradationsverhältnisse.

Als weitere Methode zum Studium mechanischer Eigenschaften geringer Mengen biologischer Medien oder lebender Zellen nenne ich die Messung der Viskosität. Es ist Ihnen bekannt, daß auch dafür zahlreiche Methoden existieren, die aber von den Forderungen typischer Mikromethoden sehr weit entfernt sind. Am meisten verwendet man sogenannte „Fließmethoden", bei welchen man die Zeit bestimmt, welche eine gegebene Menge der zu prüfenden Substanz benötigt, um entweder unter dem Einfluß ihres eigenen

---

[19]) Fischer, E. P., Arch. f. Augenheilkunde, *103*, 1930.

Gewichtes oder unter bekanntem (variablem) Druck durch eine Kapillare von bekanntem Durchmesser und bekannter Länge zu fließen. Berechnungen erfolgen auf Grund des POISEUILLE'schen Gesetzes, wenn Absolutwerte verlangt werden. Meist aber begnügt man sich mit der Bestimmung relativer (spezifischer) Viskositäten, das heißt man vergleicht unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die erhaltenen Daten mit Wasser der gleichen Temperatur.

Ich kann auf die bisher bekannten Methoden der Viskositätsbestimmung, sofern sie auch mit relativ kleinen Flüssigkeitsmengen ausgeführt werden können, nicht näher eingehen, da sie für Probleme der Zellphysiologie, also Viskositätsbestimmungen an intakten lebenden Zellen bzw. ihren Einschlüssen, und zwar in erster Linie Safträumen, einfach nicht anwendbar sind. Abgesehen von biologischen Viskositätsmessungen[20]) nach der „Zentrifugierungsmethode" und der „Fallmethode", denen das STOKES'sche Gesetz zugrunde liegt, haben wir derzeit noch eine einfache Mikromethode[21]) zur Verfügung, welcher die Messung der Lebhaftigkeit — nicht der wahren Geschwindigkeit! — der BROWN'schen Molekularbewegung kleiner Masseteilchen zugrunde liegt.

Bekanntlich sind kleine, in einer Flüssigkeit suspendierte Masseteilchen, sofern sie eine bestimmte Größe nicht überschreiten und dann unter dem Einfluß der Schwerkraft fallen (sedimentieren), in einer namentlich bei Beobachtung mit stärkerer mikroskopischer Vergrößerung leicht kenntlichen ununterbrochenen, dabei vollkommen unregelmäßigen Bewegung, die abhängig ist von der Größe der Masseteilchen, von der Temperatur und der Viskosität. Bei gleichbleibender Teilchengröße und Temperatur kann daher eine wirklich beobachtete, verschieden lebhafte Bewegung in verschiedenen Medien nur von der verschiedenen Viskosität abhängig sein, also zu ihrer Messung benützt werden. Den Weg zur Messung — nicht bloß Schätzung! — der Lebhaftigkeit BROWN'scher Molekularbewegung haben EINSTEIN und SMOLUCHOWSKI gezeigt, wobei sie von dem vereinfachenden Ansatz ausgingen, nicht die außerordentlich komplizierte räumliche Bahn der Bewegung eines gegebenen Masseteilchens zu betrachten, sondern die Veränderung seiner Lage innerhalb einer bestimmten Zeit. Denkt man sich die Lage der beiden Punkte zur Zeit $t = 0$ bis $t = 1$ durch eine Gerade verbunden, so erhält man die „Verschiebung“ des Teilchens und bei horizontaler Projektion dieser Verbindungslinie die „horizontale Verschiebung“. Für diese wurde gezeigt, daß der Quotient aus dem mittleren Quadrat der Projektion der horizontalen Verschiebung ($= \overline{x}^2$) und der Zeit ($= t$) für ein gegebenes Teilchen in einem gegebenen Medium bei gegebener Temperatur eine Konstante ist, sonach als Maß für die Lebhaftigkeit der Brownschen Molekularbewegung genommen werden kann. Es wurde weiter von Einstein bewiesen, daß die Diffusion einer Emulsion ebenso erfolgt wie die einer echten Lösung — also auch Kolloidpartikel und mikroskopisch sichtbare Teilchen sich in bezug auf sämtliche thermischen Eigenschaften wie Moleküle verhalten — und daß der Diffusionskoeffizient D durch die Formel

---

[20]) Siehe besonders HEILBRUNN, L. V., Protoplasma-Monographie, I, 1928, Bornträger. (Hier weitere Literatur.)

[21]) Siehe PEKAREK, J., Protoplasma, *10*, 1930; *11*, 1930; *13*, 1931 (Sonderheft). Daselbst weitere Literatur über die Methode.

$$D = \frac{1}{2} \cdot \frac{\overline{x}^2}{t}$$

wiedergegeben werden kann. Wenn überdies die Teilchen kugelförmig sind und ihr Durchmesser gegenüber der freien Weglänge der Flüssigkeitsmoleküle groß ist, dann kann diese Gleichung mit der des Stokes'schen Gesetzes verbunden werden und führt zu folgender Formel:

$$\frac{\overline{x}^2}{t} = \frac{R}{N} \cdot T \cdot \frac{1}{3\pi . a . \eta}$$

wobei $\overline{x}^2$ das mittlere Quadrat der Projektion der horizontalen Verschiebung bedeutet und sich durch die Beobachtung bestimmen läßt, t die Dauer einer Verschiebung, R die absolute Gaskonstante, T die absolute Temperatur, N die Loschmidt'sche Zahl, a den Teilchenradius (nicht Durchmesser!) und η den Viskositätskoeffizienten der Flüssigkeit. — Messungen nach dieser Methode, die als „Methode des mittleren Verschiebungsquadrates“ bezeichnet wird, sollen hier nicht weiter berücksichtigt werden, doch will ich nochmals hervorheben, daß bei dieser Methode die Zeiten konstant gehalten werden, dagegen die in den einzelnen Beobachtungszeiten zurückgelegten Wege, bzw. deren horizontalen Verschiebungen, gemessen werden. Diese Wege müssen natürlich verschieden groß sein, da ja nach der Theorie bei den in Betracht kommenden Beobachtungszeiten die Bewegung vollkommen regellos vor sich geht, so daß erst der Mittelwert aus der Gesamtheit aller gemessenen horizontalen Verschiebungen (beziehungsweise ihrer Projektionen) das erforderlich genaue Maß ergibt.

Man kann aber nach FÜRTH auch so vorgehen, daß man nicht die Wege bzw. die Lagen eines Masseteilchens in äquidistanten Zeitpunkten feststellt, sondern die Zeiten mißt, die das Partikel braucht, um eine bekannte Entfernung zwischen gegebenen Marken zu durchlaufen. Jede solche Zeit wird als „Passagezeit" bezeichnet, gibt also jene Zeit an, die ein Teilchen benötigt, um von einem beliebig gewählten Ausgangspunkt ($x = 0$) zu einem anderen Punkt ($x = 1$) auf derselben Koordinate zum erstenmal zu gelangen. Bei der Messung kann man nun entweder die Passagen (-zeiten) immer nur nach ein und derselben Richtung zählen oder man zählt ohne Rücksicht auf die Richtung, die Erstpassagen bei jeder erstmaligen Überschreitung einer bestimmten Marke nach rechts oder (und) links und erhält so aus einer größeren Anzahl von Beobachtungen schließlich die „mittlere doppelseitige Erstpassagezeit" (τ). Es ist dann $\tau = \frac{t}{n}$, wobei n die Anzahl der Passagen und t die für diese n-Passagen notwendige Zeit vorstellt. Es ist leicht einzusehen, daß man mit dieser Methode der „mittleren doppelseitigen Erstpassagezeitenmessung" in τ ebenso ein Maß für die Lebhaftigkeit der BROWN'schen Molekularbewegung erhält, wie bei der Methode des „mittleren Verschiebungsquadrates" mit dem Weg, gemessen an der Projektion der horizontalen Verschiebung.

Unter der Voraussetzung, daß die BROWN'sche Molekularbewegung vollkommen unregelmäßig verläuft, überdies rechtwinkelig zur Lotrechten ist, kann man bei der in Rede stehenden Methode für den Diffusionskoeffizienten folgende Formel ableiten:

$$D = \frac{1}{2} \cdot \frac{l^2}{\tau}$$

wobei l den Abstand zwischen je zwei Wegmarken (Okularmikrometer!) bezeichnet und τ die mittlere doppelseitige Erstpassagezeit.

Bei Einbeziehung des STOKES'schen Gesetzes, für dessen Anwendung alle Voraussetzungen gegeben sind, und der EINSTEIN'schen Formel erhält man schließlich:

$$\frac{l^2 . n}{t} = \frac{R}{N} . T . \frac{1}{3 \pi . a . \eta}.$$

Mit Hilfe dieser Gleichung ist z. B. der Teilchenradius sonst schwer einer Messung zugänglichen Partikel bestimmt worden. Es bedarf aber, wie leicht ersichtlich, nur einer einfachen Umformung dieser Gleichung, um die Viskosität[22]) zu bestimmen, wenn der Radius irgendeines Masseteilchens, an welchem die BROWN'sche Molekularbewegung verfolgt werden kann, überhaupt meßbar ist. Man erhält dann:

$$\eta = \frac{R}{N} . T . \frac{t}{3 \pi . a . l^2 . n},$$

wobei η die Viskosität, R die absolute Gaskonstante, N die LOSCHMIDT'sche Zahl, T die absolute Temperatur, t die während der Gesamtheit aller gezählten Passagen verflossene Zeit, a den Teilchenradius, l die wahre Größe des Abstandes zwischen den Wegmarken und n die Anzahl der gezählten Passagen bedeutet. R, N, T sind bekannt, t wird von der Stoppuhr abgelesen, a im Mikroskop direkt gemessen, l als Abstand zweier Rasterteilstriche bestimmt und n wird während des Versuches gezählt. Unbekannt bleibt also nur η, kann sonach aus der Gleichung berechnet werden und führt zur Kenntnis der absoluten Viskosität. Mit Rücksicht auf die außerordentlichen Vorteile dieser Methode halte ich es nicht für überflüssig, auch noch den Gang eines speziellen Versuches[23]) zu beschreiben.

„Wir hätten die Aufgabe, die Viskosität der Vakuolenflüssigkeit einer pflanzlichen Zelle zu bestimmen. Im Zellsafte befänden sich einige Partikelchen von kugelförmiger Gestalt in BROWN'scher Molekularbewegung, die wir unter dem Mikroskop mit einem ZEISS'schen Objektiv 60 Apochromat 3 mm mit Korrektionsfassung und einem ZEISS'schen Kompensationsokular K 20 × beobachten. Im Okular befände sich ein Raster mit einer quadratischen Teilung in 60×60 Elemente. Durch Vergleich mit einem ZEISS'schen Objektmikrometer hätten wir die Distanz zweier benachbarter Teilstriche des Rasters mit $1,7 . 10^{-4}$ cm festgestellt. Wir stellen nun ein bestimmtes kugelförmiges Partikelchen scharf ein, das sich mitten im Zellsaft frei bewegt und messen die Größe dieses Teilchens gleich mit dem im Okular befindlichen Raster. Wir schätzen seinen Durchmesser auf 0,7 eines Rasterabstandes, wobei sich die Schätzung leicht auf ein Zehntel durchführen läßt. Der Radius des Teilchens ist daher 0,35 von 1 (= Abstand der Rasterteilstriche) oder in Zentimeter umgerechnet $5,83 . 10^{-5}$ cm. Nach diesen Vorbereitungen verfolgen wir bei ständiger Scharfeinstellung mittels Mikrometerschraube des Mikroskopes genau die Bahn, die das Teilchen in einer bestimmten Zeit durchläuft. Nachdem bei der verwendeten Vergrößerung das Teilchen natürlich nicht als Punkt erscheint, wollen wir uns dahin einigen, den im Mikroskop gesehenen linken Rand seines Äquators bei der Registrierung der Passagen zu benützen. In Fig. 3 ist nun ein solcher fiktiver Weg eines in BROWN'scher Molekularbewegung befindlichen Teilchens dargestellt. Im Moment, da wir die Stoppuhr abgedrückt haben, hat genau der linke Rand den Rasterteilstrich c bei Null passiert, die Messung beginnt. Das Teilchen wandert, wie die Fig. 3 zeigt, in ruckweise zitternder Bewegung zuerst nach oben, dann unter Beibehaltung der Aufwärtsbewegung nach links und übersetzt nach kurzer Zeit die Ausgangslinie c des Rasters. Dieses Überschreiten dürfen wir nicht als Passage rechnen. Kurze Zeit tänzelt das Kügelchen auf der linken Seite der Rasterlinie c weiter nach aufwärts, wendet sich plötzlich nach rechts, überquert sie abermals. Nach kurzer Bewegung wird die Rasterlinie d erreicht, der linke Rand des Kügelchens passiert bei 1 die Rasterlinie d; wir zählen die erste Passage. Zugleich bedeutet 1 den Ausgangspunkt für eine neue Passage. Das Teilchen wandert nun längere Zeit in stetigem Hin und Her nach abwärts, durchzieht die Linie d — wie aus der Figur ersichtlich — mehrmals, aber erst bei 2 auf der Rasterlinie c registrieren wir die zweite Passage. Bald folgt bei 3 auf der Rasterlinie b die dritte, dann wieder nach längerer Zeit bei 4 auf der Rasterlinie c die vierte, bei 5 auf der Rasterlinie d die fünfte, bei 6 auf der Rasterlinie e die sechste Passage usw. Sobald der linke Rand des Kügelchens bei 10 die Rasterlinie a berührt, stoppen wir die Uhr; der Versuch, das heißt eine Messung ist beendet. Wir zählen insgesamt 10 Passagen bei einer Beobachtungszeit von 75 Sekunden. Die während des Versuches herrschende Zimmertemperatur ist 23 Grad, als absolute Temperatur sonach 296 Grad. Wir schätzen nochmals den Durchmesser des Kügelchens ab, um sicher zu sein, daß sich seine Größe im Verlauf des Versuches nicht geändert hat.“ (Pekarek, S. 520—521.)

---

[22]) Siehe FÜRTH, R., Zeitschr. f. Physik, *60*, 1930.

[23]) Siehe besonders PEKAREK, I. und III. Mitteilung. Protoplasma, 1930 und 1931.

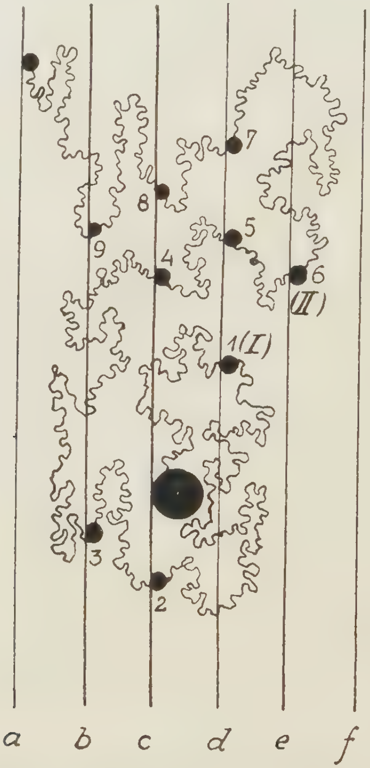


Fig. 3. Skizze eines Versuches zur Bestimmung der doppelseitigen Erstpassagezeit bei der Brown'schen Molekularbewegung. (Näheres siehe Text.) Figur nach Pekarek.

Mithin haben wir alle Größen, die für die Bestimmung der Viskosität nach der Methode der mittleren doppelseitigen Erstpassagezeiten notwendig sind, denn:

$$\frac{R}{N} \cdot \frac{1}{3\pi} = 0{,}145 \cdot 10^{-16},\ T = 296,\ t = 75,\ a = 5{,}83 \cdot 10^{-5},$$

$l = 1{,}7 \cdot 10^{-4}$, $n = 10$.

In die Formel eingesetzt, erhalten wir schließlich $\eta = 1{,}995 \,.\, 10^{-2}$ oder korrigiert: *0,02*.

Die absolute Viskosität des geprüften Zellsaftes ist nach dieser einen Messung sonach ungefähr doppelt so groß wie die von Wasser gleicher Temperatur, für welche bei 23° C die Viskosität 0,0095, also korrigiert 0,01 beträgt.

Selbstverständlich sind nun weitere Messungen notwendig, um möglichst genaue Mittelwerte zu erhalten. Auf Einzelheiten der Fehlerberechnung[23]) kann ich hier nicht weiter eingehen, denn wichtiger scheint mir der Hinweis auf die Vorteile[23]) dieser Methode speziell im Dienste zellphysiologischer Probleme. Man bedenke z. B. folgendes:

Für diese Messungen benötigt man keinerlei spezielle Versuchsanordnung oder Apparatur, sondern bloß ein Okularraster.

Man erhält bei genau präzisierbaren (!) Fehlerquellen absolute und nicht relative Viskositäten, wobei die Voraussetzungen für die einfachen Berechnungen derart sind, daß sie in biologischen Medien nahezu allgemein realisiert sind.

Trotzdem in der theoretischen Ableitung das STOKES'sche Gesetz verwendet wird, ist bei dieser Methode die Kenntnis der Dichte weder der Flüssigkeit noch des Probekörpers notwendig. Alle erforderlichen Daten (Temperatur, Versuchsdauer, Partikelradius, Rasterabstand und Passagenanzahl) sind einfach zu ermitteln.

Die zur Viskositätsmessung ausreichenden Mengen des zu prüfenden Mediums oder die Größe der Räume, in welchen Messungen vorgenommen werden können, sind derart gering — nach μ^3! —, daß keine andere Methode damit konkurrieren kann.

Es ist mit dieser Methode vor allem möglich, Messungen direkt an lebenden Zellen unter dem Mikroskop vornehmen zu können, ohne das Versuchsobjekt selbst im geringsten zu alterieren, so daß man auf naturgegebene Viskositätsverhältnisse unbedingt schließen kann. Es ist sogar möglich, Viskositätsmessungen an verschiedenen Teilen einer einzigen Zelle oder zu verschiedenen Zeiten auszuführen und vorher gefundene Werte mit solchen nach experimentell gesetzten Einflüssen am gleichen Objekt zu vergleichen.

---

[23]) Siehe besonders PEKAREK, I. und III. Mitteilung. Protoplasma, 1930 und 1931.

Partikel, die sich als „Probekörper“ zur Messung eignen, finden sich unter natürlichen Verhältnissen schon in der weitaus größten Zahl tierischer oder pflanzlicher Objekte vor oder können mit einem Minimum schädigender Einflüsse mit Hilfe vitaler Färbungen leicht erzeugt werden.

Diesen Vorteilen stehen nur drei Nachteile gegenüber, und zwar:

Mit der Methode der „mittleren doppelseitigen Erstpassagezeiten“ sind Messungen an Flüssigkeiten praktisch bloß bis zu einer Viskosität möglich, die ungefähr 60mal größer ist als die von Wasser gleicher Temperatur. Bei Bestimmungen, die für den Biologen in Betracht kommen, dürfte aber dieser Nachteil nur in Ausnahmefällen störend wirken, außerdem kann durch geeignete Wahl feinerer Raster und stärkerer Vergrößerung der Beobachtungsbereich noch erweitert werden.

Das zu prüfende Medium muß während der Versuchsdauer sich in Ruhe befinden, eine Forderung, die ebenfalls bei der weitaus größten Zahl der Medien, auch lebender Versuchsobjekte, erfüllt sein dürfte.

Schließlich muß beachtet werden, daß die Genauigkeit der Messung von der Zahl der Einzelmessungen abhängig ist, um einen möglichst genauen Mittelwert zu erlangen. Aber auch dieser Nachteil, den man schließlich für jede messende Methode geltend machen könnte, dürfte nicht schwer ins Gewicht fallen, da ja innerhalb weniger Minuten bei deutlicher Brown'scher Molekularbewegung in jedem einzelnen Versuch genügend viele Passagen gezählt werden können. Bei dieser Methode ist überdies die Zahl der Passagen ungleich größer als bei der an sich ebenso brauchbaren Methode der „einseitigen Erstpassagen“. (Aus der Fig. 3 ist z. B. zu entnehmen, daß bei einseitiger Passagezeitmessung, z. B. nur nach rechts, nur zwei Passagen [I und II] registriert wären, während in der gleichen Zeit nach der diskutierten Methode schon 10 Passagen vorkommen.)

Es ist einleuchtend, daß mit dieser Methode nicht nur die verschiedensten Objekte, sondern vor allem die verschiedensten biologischen Probleme unter günstigsten Bedingungen solchen Untersuchungen zugänglich sind, bei welchen die Kenntnis der Viskosität entweder direkt notwendig ist oder bei welchen physiologische Änderungen an den sehr empfindlichen Viskositätsänderungen studiert werden sollen. Ich kann hier auf bisherige Ergebnisse nicht weiter eingehen, sondern weise nur kurz darauf hin, daß man z. B. noch verschiedener Meinung darüber ist, ob lebendes Protoplasma einen typischen Durchschnittswert aufweist, der nur 5- bis 10mal oder 10- bis 50mal oder gar einige 100mal größer ist als Wasser gleicher Temperatur. Die bisherigen Ergebnisse (auch z. B. ad Serum, Blutplasma usw.) bedürfen daher vielfach einer Überprüfung und Ergänzung, um mit Sicherheit über Viskosität und ihre Änderungen im biologischen Milieu Aussagen machen zu können.

Die Methode sollte wegen ihrer Einfachheit und gesicherten theoretischen Grundlage zusammen mit den typischen Vorteilen einer Mikromethode auch bei nicht biologischen Arbeiten verwendet werden.

Im Hinblick auf die bereits bewiesene oder vermutete Bedeutung des Dispersitätsgrades gefärbter und ungefärbter gelöster Stoffe für Probleme der Permeabilität, Exkretion, Sekretion usw. will ich auch auf geeignete Mikromethoden näher eingehen, deren Vorzüge ebenfalls ohne längere Diskussion ersichtlich sind.

In den meisten physiologischen Arbeiten findet man bezüglich des Einflusses der Teilchengröße gelöster Stoffe, welche ja als Maß der Dispersität dient, sehr bestimmt gehaltene Behauptungen. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, zeigt aber eine kritische Durchsicht des experimentellen Teiles solcher Studien, daß Bestimmungen ad hoc nicht vorgenommen wurden. Man begnügt sich in der Regel mit ganz allgemeinen Hinweisen wie kolloid oder molekular gelöst und grob oder fein dispers oder man legt den Hypothesen Untersuchungen der Kolloidchemiker oder Physiker zugrunde oder schließt aus irgendwelchen Gründen per analogiam, daß eine bestimmte Lösung einen bestimmten Dispersitätsgrad aufweisen muß. Nun ist gerade in diesem Falle die Forderung nicht zu umgehen, daß man nicht z. B. für einen Farbstoff schlechthin, sondern an der eben verwendeten Lösung bei den eben gegebenen Versuchsbedingungen Bestimmungen vornimmt, denn der Dispersitätsgrad ist durch so viele und so verschiedene Bedingungen beeinflußbar, daß eine einmalige Bestimmung nichts beweisen kann. Diese vielseitige Abhängigkeit des Lösungszustandes eines Stoffes in bezug auf die Teilchengröße würde sogar berechtigen, zu Dispersitätsmessungen irgendeinen der vielen Faktoren heranzuziehen, der den Dispersitätsgrad beeinflußt bzw. von ihm abhängt. In praxi sind aber Messungen der freien Diffusion einer Lösung[24]) in das Lösungsmittel allen anderen Methoden weit überlegen, unter anderem auch durch die Sicherheit der theoretischen Begründung. Ohne auf Einzelheiten hier näher einzugehen, weise ich nur darauf hin, daß die bestimmende Größe in diesem Fall der Diffusionskoeffizient*) ist, der für jede Lösung eine charakteristische Größe darstellt, die abhängt: von der speziellen Natur des Lösungsmittels, der Viskosität, der Temperatur und außerdem von der Konzentration des gelösten Körpers. Die wichtigste für solche Untersuchungen ganz allgemein in Betracht kommende Beziehung ist in der Einstein'schen Formel niedergelegt:

$$D = \frac{R}{N} \cdot T \cdot \frac{1}{6\,\pi \,.\, a \,.\, \eta}$$

aus welcher durch Umformung sich der Teilchenradius a ergibt:

$$a = \frac{R}{N} \cdot T \cdot \frac{1}{6\,\pi \,.\, \eta} \cdot \frac{1}{D}$$

In diesen Formeln bedeutet: R die absolute Gaskonstante, N die Loschmidt'sche Zahl, T die absolute Temperatur, a den Teilchenradius, η die Viskosität des Lösungsmittels (nicht der Lösung selber, wie vielfach angenommen wird!) und D den Diffusionskoeffizienten.

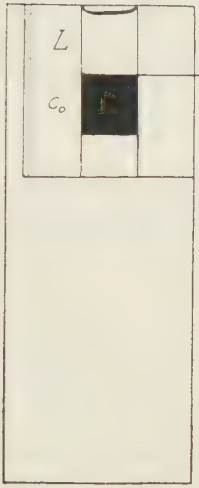
---

[24]) Fürth, R., Kolloidchem. Beih., *28*, 1929. — Handb. d. phys. und tech. Mechanik, VII, 1930. — v. Hahn, F., Dispersoidanalyse. Handb. der Kolloidwissensch., III. Steinkopff, Dresden 1928. — Nistler, A., Kolloidchem. Beih., *31*, 1930. — In diesen Arbeiten weitere Literatur.

*) Das ist nicht die sogenannte „Diffusionsgeschwindigkeit“, die man in Arbeiten von Biologen oft irrtümlich als Maß der Diffusion nimmt. (Siehe dazu besonders die Klarstellung von R. Fürth: Kolloidchem. Beihefte, 28. Bd., 1929, Artikel Dispersoidanalyse.)

Zur strengen Gültigkeit dieser Formeln ist vorausgesetzt: 1. daß ein monodisperses System vorliegt, also ein solches einheitlicher Teilchengröße, 2. die Diffusion in einem homogenen Lösungsmittel erfolgt und 3. die Teilchen kugelförmig sind.

Diffusionsversuche in makroskopischen Dimensionen sind aber nicht einfach, denn die Versuchsdauer ist wegen der Langsamkeit der Diffusion sehr groß und kann sich auf Tage und Wochen erstrecken, wobei Erschütterungsfreiheit und Temperaturgleichheit streng gewahrt bleiben müssen. Das sind Bedingungen, die solche Versuche für Zwecke des Biologen oder Mediziners meist wohl ausschließen. Dagegen gelingt es durch den Kunstgriff der Verkleinerung des Diffusionsraumes und Beobachtung der Diffusionswege in mikroskopischen Dimensionen diese Nachteile praktisch auszuschalten und außerdem ohne besondere Versuchsanordnung Temperaturkonstanz während der Versuchsdauer zu erlangen. Für die Methode selbst ergibt sich aber damit ein eminenter Vorteil insofern, als gemäß der Definition des Diffusionskoeffizienten die Zeiten den Quadraten der Diffusionswege proportional sind, daher bei mikroskopischer Beobachtung die Versuchsdauer bedeutend verringert werden kann. Mit der Verkleinerung des Diffusionsweges, z. B. von 10 mm auf 0,1 mm, wird die Beobachtungszeit von zirka einer Woche auf eine Minute reduziert.



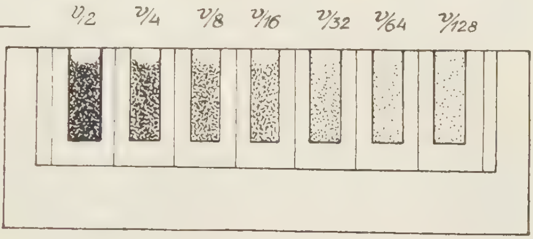


Fig. 5.

Fig. 4. Diffusionskammer zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten und nachfolgender Berechnung der Teilchengrößen von Farbstoffen.

Fig. 5. Vergleichskammer zu Fig. 4 mit Verdünnungen der Lösung bekannter Konzentration.

Fig. 4.

Die praktische Durchführung dieser von Fürth ausgearbeiteten, dann später von Nistler und Gicklhorn verbesserten Mikromethode[25]) gestaltet sich folgendermaßen, wenn Farbstoffe (oder ganz allgemein gefärbte Verbindungen) in bezug auf Diffusionskoeffizienten und Teilchengrößen untersucht werden sollen:

Eine Ausgangslösung bekannter Konzentration c wird in die untere Hälfte einer Mikrokammer von der aus der Fig. 4 ersichtlichen Form gefüllt und mit dem Schieber S von dem darüber geschichteten reinen Lösungsmittel bis zu Beginn des Versuches getrennt. Von der gleichen Lösung der Konzentration c stellt man weiters verschiedene Verdünnungen im Verhältnis v/2, v/4, v/8, v/16 usw. her und füllt Proben jeder solchen Verdünnung in ebenso dicke Vergleichskammern, welche nicht unterteilt sind, so daß man in der aus Fig. 5 ersichtlichen Anordnung später eine Anzahl Vergleichslösungen nebeneinander beobachten kann. Bei Beobachtung mit einem Doppelmikroskop und Vergleichsokular kann man in einem Gesichtsfeld die Bilder der Ausgangslösung und irgendeiner der Vergleichslösungen nebeneinander überblicken (vergleiche Fig. 6). Im Okular des Vergleichsokulars ist ein Mikrometer eingesetzt, dessen Nullpunkt zu Beginn des Versuches mit dem Schieberrand zur Deckung gebracht wird. Sobald der Schieber S herausgezogen wird, setzt die Diffusion der Lösung gegen ihr Lösungsmittel und umgekehrt ein und man sieht nun im mikroskopischen Bild eine sich ständig ausbreitende Diffusionszone, welche ganz

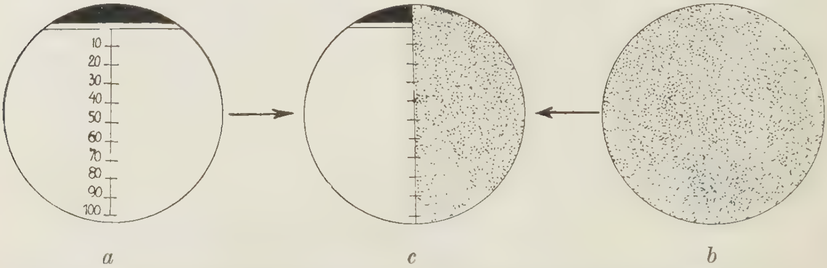


Fig. 6. Schematische Darstellung des mikroskopischen Bildes der Diffusionskammer und einer der Lösungen in der Vergleichskammer. (In der mittleren Figur beide mikroskopischen Bilder optisch nebeneinander, so daß die Ausgangslösung der Konzentration c, der Schieber S, das Lösungsmittel L, die Vergleichslösung v/8 und das Mikrometer in einem Bilde überblickt werden können.

---

[21]) Siehe Fußnote 24.

allmählich im Lösungsmittel sich verliert. In dieser Diffusionszone müssen sämtliche Konzentrationen an bestimmten Stellen zu bestimmten Zeiten vorhanden sein, die in den Vergleichslösungen von bekanntem Verdünnungsverhältnis vorliegen und die gegenüber der Ausgangslösung einen ganz bestimmten Farbton aufweisen. Mit Hilfe eines beweglichen und verschiebbaren Blendenspaltes kann man bei einiger Übung recht genau kolorimetrische Vergleiche anstellen und damit die zu bestimmter Zeit gegebene Lage einer bestimmten Konzentration inmitten aller anderen der Diffusionszone erkennen (Fig. 7). Der wahre Weg gegenüber der Ausgangslage kann im Okularmikrometer gemessen werden, die zugehörige Zeit an einer ab Versuchsbeginn laufenden Stoppuhr abgelesen werden, so daß man die den Diffusionskoeffizienten bestimmenden Daten x (Weg) und t (Zeit) kennt. Aus einer von Fürth ausgearbeiteten Tabelle kann der entsprechende Wert der Verdünnungsfunktionen f (v) abgelesen werden. Man hat also sämtliche für die Berechnung von $D = \frac{x\,2}{t} . f\,(v)$ notwendigen Daten. Aus einer von Nistler ausgearbeiteten Tabelle können überdies D und a für die Temperatur von 18° C direkt entnommen werden. Wenn man für jede Verdünnung im gleichen Versuch den Weg und die Zeit der Diffusion ermittelt, so erhält man sonach gleich die Daten für einen relativ großen Konzentrationsbereich, ohne daß irgendein bestimmtes Gesetz der Diffusion vorausgesetzt werden muß. Wegen weiterer Einzelheiten muß ich auf die Originalarbeiten verweisen²⁶).

Im Hinblick auf die erwähnte Bedeutung des Dispersitätsgrades für biologische Versuche will ich aber diesmal einige der bisherigen Ergebnisse ausdrücklich hervorheben.

Nach den bereits vorliegenden genauen Untersuchungen mit dieser Methode läßt sich zeigen, daß es unter den geprüften Farbstofflösungen Gruppen von ganz verschiedenem Verhalten gibt, daß aber diese Gruppen keine Zusammenhänge mit den bisher in der Biologie üblicherweise betonten Farbstoff-

---

[26]) Das neue „Diffusionsmikroskop" wird von der Firma Reichert in Wien erzeugt.

reihen oder den speziellen Kriterien ihrer Unterscheidung erkennen lassen. So ist zum Beispiel aus nachstehender Tabelle I ersichtlich, daß es Farbstofflösungen gibt,

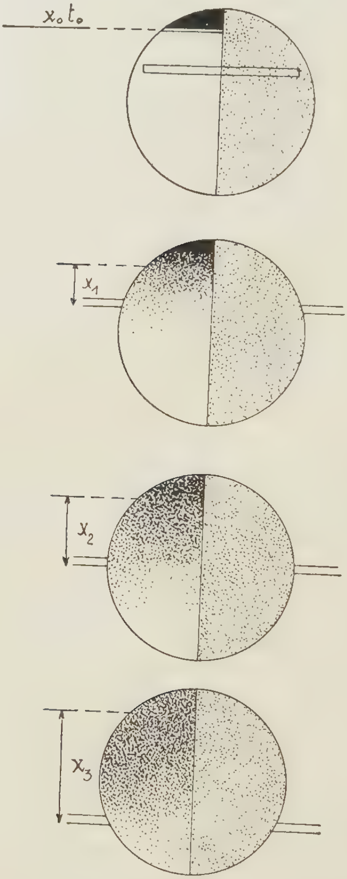


Fig. 7. Aufeinanderfolgende Stadien der Diffusion und Aufsuchen der bestimmten Lage (d. i. Wege x_1 x_2 x_3) einer bestimmten Vergleichslösung zu verschiedenen Zeiten t_1 t_2 t_3.

welche innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches im Durchschnitt *unverändert gleiche Teilchengröße* zeigen. Dabei halte ich für besonders bemerkenswert, daß sich unter diesen Farbstoffen sowohl typisch kolloide als auch ausgesprochen molekulardispers gelöste vorfinden.

Tabelle I.

Teilchenradien (x . 10^{-8} cm) (siehe Nistler, S. 44).

Farbstoffe	0,125 %	0,062 %	0,031 %	0,016 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
Berlinerblau wasserlösl.	114,0	114,0	114,0	114,0	114,0	—	-
Kongorot	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	—
Wasserblau	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8
Trypaflavin	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

Eine andere Gruppe von Farbstoffen, die ganz verschiedenen chemischen Klassen angehören und sowohl saure als auch basische umfaßt, zeigt eine ausgesprochene Abhängigkeit der Teilchengröße von der Konzentration[27], die von Farbstoff zu Farbstoff verschieden ist und das Doppelte bis Vierfache des Teilchenradius ausmachen kann. Auch in dieser Gruppe sind relativ grob disperse neben molekulardispersen zu finden.

Tabelle II.

Farbstoffe	0,125 %	0,062 %	0,031 %	0,016 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
Isaminblau	20,5	16,0	13,0	12,5	11,7	—	—
Kongorubin	16,7	12,1	10,6	9,7	9,3	8,4	8,1
Cyanol	14,2	10,5	8,5	8,3	8,0	—	—
Methylenblau	13,5	9,2	6,7	5,4	4,6	4,1	3,5
Magdalarot	8,9	8,4	7,6	6,9	6,8	5,8	5,4
Rose bengale	7,4	7,0	6,3	5,5	5,1	4,9	4,8
Neutralrot frische Lösung	7,4	5,9	5,6	5,2	5,4	5,2	—
Bismarckbraun	6,6	5,6	5,2	3,9	3,6	3,1	—
Safranin	5,8	5,3	5,1	4,9	-	4,4	—
Aurantia 1 Jahr alte Lösung	3,9	3,5	3,2	2,9	2,7	—	—

Besonders bemerkenswert ist der Nachweis, daß beträchtliche Schwankungen der Teilchengröße in Abhängigkeit vom Alter der Lösung auftreten, wobei die Veränderung nach mehr oder minder langer Zeit zu einer Stabilisierung führt, die entweder im Sinne einer Verfeinerung (Aurantia) oder einer Vergröberung (Pyrrholblau) erfolgen kann. Das zeigt die nachstehende Tabelle.

---

[27] Mit solchen Farbstoffen kann natürlich keine Eichung von Ultrafiltern vorgenommen werden, wenn nicht die Konzentration, das Alter der Lösung usw. vorher genau bekannt ist.

Tabelle III.

Farbstoffe	0,125 %	0,062 %	0,031 %	0,016 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
Aurantia frisch	11,6	7,7	6,7	5,6	4,5	—	—
Aurantia bis 1 Tag alte Lösung	4,9	5,2	4,9	4,7	4,4	—	—
Aurantia 1 Jahr . . .	3,9	3,5	3,2	2,9	2,7	—	—
Pyrrholblau bis 17 Stdn.	40,0	23,0	18,3	15,7	—	17,5	—
Pyrrholblau 16 Tage .	94,0	39,0	26,5	20,5	17,6	—	—
Uranin bis 7 Stunden .	2,5	3,2	3,6	3,4	3,9	—	4,07
Uranin 11 Tage	9,1	5,6	4,8	4,7	4,3	—	—
Uranin 2 Monate . . .	8,7	6,4	5,2	5,0	4,6	4,2	—

Wie wenig sich auf Grund der Kenntnis von Atomzahl oder Molekulargewicht ein bestimmtes davon abhängiges Verhalten voraussagen ließe, ergibt sich aus folgender Zusammenstellung:

Tabelle IV.

Farbstoffe	Atomzahl	Molekulargewicht	0,125 %	0,062 %	0,031 %	0,016 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
Methylenblau	37	317,5	13,5	9,2	6,7	5,4	4,6	4,1	3,5
Eosin A frisch	37	692	5,1	5,3	5,3	4,7	4,5	—	—
Eosin 1 Tag .	37	—	9,2	6,3	6,4	—	6,0	—	4,8
Erythrosin 2 Stunden .	37	880	6,2	5,5	5,6	5,3	—	4,9	—
Erythrosin 2 Monate .	37	—	5,4	4,8	4,8	4,8	—	4,3	—
Rose bengale	37	1050	7,4	7,0	6,3	5,5	5,1	4,9	4,8

Ich brauche diese Befunde nicht weiter durch Aufzählung anderer zu ergänzen, um sagen zu können, daß ohne ausdrückliche Bestimmungen der eben verwendeten Lösung nur äußerst unsichere Angaben über die Dispersitätsverhältnisse von Farbstofflösungen gemacht werden können und bisherige Behauptungen einfach unzutreffend sind[28]). Dabei darf nicht außer acht gelassen werden, daß in den bisher genauer untersuchten Fällen absichtliche Eingriffe und damit Änderungen der Lösungsbedingungen nicht vorgenommen wurden und daß bisher ausschließlich destilliertes Wasser als einfachstes Lösungsmittel verwendet wurde. Jeder wird leicht einsehen, wie kompliziert die Verhältnisse unter weniger einfachen Bedingungen sein dürften und wie wenig berechtigt Meinungen und Hypothesen eigentlich sind, welche heute von Biologen und Medizinern ad Teilchengrößen von gelösten Farbstoffen im Blut, Liquor[29]) usw. oder über die Bedeutung oder gar die spezielle Art der Einflüsse des Dispersitätsgrades fallweise verwendeter Farbstofflösungen vorgebracht werden. Es würde aber hier zu weit führen, wenn ich die einschlägigen Beobachtungen und Ansichten kritisch diskutieren wollte.

Nach dem gleichen, voranstehend erörterten Prinzip kann aber auch die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten und der Teilchengrößen farbloser[30]) Stoffe beziehungsweise Lösungen durchgeführt werden, wenn die Konstruktion der Meßkammer und die Versuchsanordnung geändert wird. Die Messung der Diffusion erfolgt unter sonst gleichen Verhältnissen durch Bestimmung des Brechungsquotienten, das heißt bei geeigneter Versuchsanordnung der Grenzwinkel der Totalreflexion beobachtet wird. Der Absolutwert des Brechungsquotienten braucht aber nicht bekannt zu sein, denn durch vorherige Eichung mit verschiedenen Konzentrationen, die wieder in bekanntem Verdünnungsverhältnis von der Ausgangslösung hergestellt werden, wird die jeweils bestimmte Stellung der Diffusionskammer einfach empirisch ermittelt.

---

[28]) Siehe dazu die kritische Studie von GICKLHORN über die Grundlagen und Beweise der Ultrafiltertheorie der Permeabilität. Protoplasma, *13*, 1931. Sonderheft.

[29]) Biologische und medizinische Studien, sofern sie z. B. Vitalfärbungen verwenden, können der Forderung einer genaueren Dispersitätsbestimmung nicht ausweichen. Es liegt derzeit keine Arbeit vor, welche über den Lösungszustand von Farbstoffen im Blute einwandfreie Daten brächte, denn der erste Versuch von FISCHER (Arch. f. Augenheilkunde, *103*, 1930) entspricht leider nicht den Erwartungen.

[30]) Vgl. SÜLLMANN, H., Protoplasma, *13*, 1931. Sonderheft. — ZUBER, R., Physik. Zeitschr., *30*, 1929. — FÜRTH, R., Handb. d. phys. u. techn. Mechanik, *7*, 1930.

„Als Meßkammer dient eine Mikrokammer, deren Konstruktion aus der Fig. 8 und 9 ersichtlich ist. An der Kathetenfläche des Glasprismas P wird durch Aufkitten von Glasstreifen eine unterteilte Kammer hergestellt, die es gestattet, mit Hilfe eines Schiebers S die Ausgangskonzentration vor Beginn des Versuches von dem darüber geschichteten Lösungsmittel zu trennen. Die Schmalseite der Kammer ist durch einen dünnen mit Schellack mattierten Deckglasstreifen D abgeschlossen, an dem der Schieber S genau angrenzt. Wenn ein Lichtstrahl L auf die Hypothenusenfläche des Glasprismas P auffällt (vgl. Fig. 9), gelangt er nach zweimaliger Brechung in die Kammer, aus der er durch die Mattscheibe austritt, auf welcher sich der Austrittspunkt auf Grund der diffusen Reflexion des Lichtes scharf abbildet. Das Prisma sitzt mit vertikaler Kante zentriert auf einem drehbaren Tisch; die mikrometrisch bewirkten Drehungen desselben lassen sich an einem Nonius auf Bogenminuten genau beobachten.

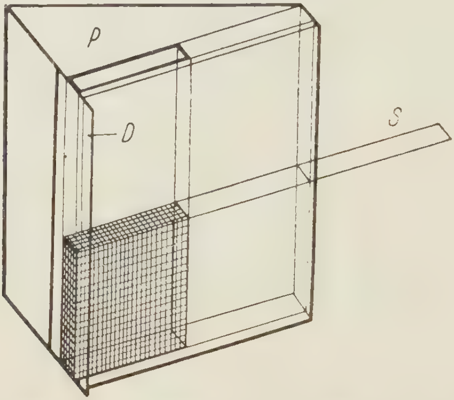


Fig. 8. Schematische Darstellung der Mikrokammer zur Messung der Diffusionskoeffizienten farbloser Lösungen. P = Glasprisma, D = mattiertes Deckglas, S = Schieber. Die Schraffierung der unteren Kammerhälfte soll die durch den Schieber abgeschlossene Ausgangslösung darstellen, über welche das Lösungsmittel geschichtet wird. (Nach Süllmann.)

Zur Beleuchtung des Prismas mit der Mikrokammer verwendet man eine Quarzglasquecksilberdampflampe, welche in einem mit einem Glasfenster versehenen Blechgehäuse steht und durch einen Luftstrom gekühlt wird. Die Lichtstrahlen gelangen (siehe Fig. 10) von der Lampe L durch eine Sammellinse S auf die im Focus befindliche punktförmige Blende B eines Kollimators K, der das eintretende Licht zu einem streng parallelen Bündel umbildet, das auf die Hypothenusenfläche des montierten Glasprismas P auffällt. Zwischen der Blende B und der Sammellinse S ist ein Lichtfilter F vorgeschaltet, welches die besonders intensive grüne Linie von 5461 Ångström herausfiltert. Durch diese Versuchsanordnung ist

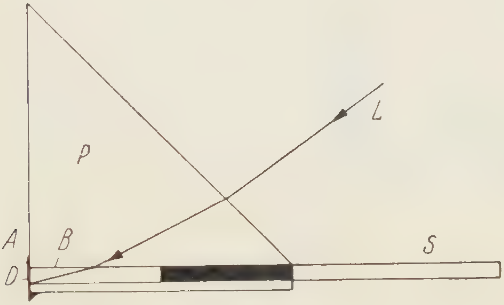


Fig. 9. Darstellung des Strahlenganges in der Mikrokammer von Fig. 8. (Aufsicht.) L = Lichtstrahl, B = Prismenfläche, an der das Licht entweder total reflektiert wird oder in die Lösung eintreten kann, S Schieber, D = Deckglas, A = Prismenkante. Versuchsanordnung zur Messung der Diffusionskoeffizienten farbloser Flüssigkeiten. (Näheres im Text.) Nach **Süllmann.**

also ein monochromatisches, streng paralleles Lichtbündel erzielt, so daß der Grenzwinkel der Totalreflexion für diese Wellenlänge genau gemessen werden kann. Das Prisma P ist auf einem drehbaren Tisch so montiert, daß die Mattscheibe D genau zentriert ist und mit einem fix eingestellten Mikroskop M bei schwacher Vergrößerung beobachtet werden kann.“ (Süllmann.)

Bevor eine Messung ausgeführt werden kann, wird die Eichung vorgenommen, und zwar in folgender Weise: Man füllt die ganze Kammer bei herausgezogenem Schieber mit einer bestimmten Konzentration der zu prüfenden Lösung und stellt bei gut fixiertem Prisma fest, bei welcher Winkelstellung eben an der Fläche B

Totalreflexion eintritt. Bei dieser Stellung erscheint das Gesichtsfeld vollkommen dunkel, doch hellt es sich sofort auf, wenn diese Winkelstellung nur geringfügig verändert wird. Die Lichtstrahlen treten dann eben nicht mehr streifend aus. Diese Bestimmung wird für jede der erforderlichen Verdünnungen v/2, v/4, v/8, v/16 usw. vorgenommen und die Winkelstellung des Prismas am Nonius des mit Gradeinteilung versehenen Tisches abgelesen. Die Eichwerte werden am besten dann kurvenmäßig auf Millimeterpapier dargestellt.

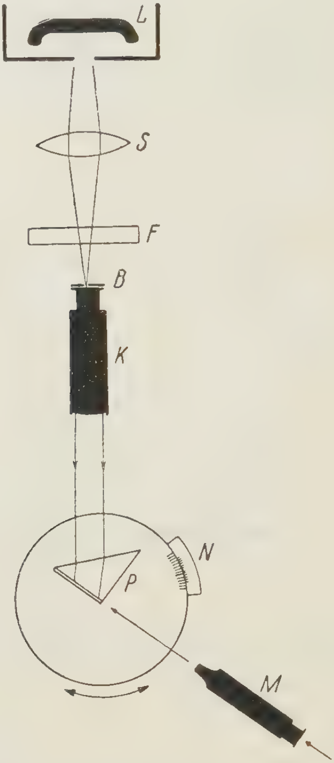


Fig. 10. Meßanordnung zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten nach Zuber (Figur nach Süllmann). Näheres im Text.

Die Ausführung des eigentlichen Versuches gestaltet sich nach Süllmann folgendermaßen:

„Man füllt die Ausgangslösung von bekannter Konzentration c in die Mikrokammer, verschließt mit dem Schieber S, saugt zunächst mit einer feinen Pipette, dann mit Filterpapier die restliche Lösung aus der oberen Kammerhälfte sorgfältig ab und schichtet bei geschlossenem Schieber S das Lösungsmittel darüber. Das Aussehen des mikroskopischen Bildes zu Beginn des Versuches gibt Fig. 11 wieder; die untere Kammerhälfte mit der zu prüfenden Lösung ist dunkel, der Schieber S deutlich an der Wand sichtbar und das Lösungsmittel in der oberen Kammerhälfte bis auf einen schmalen dunklen Streifen im mikroskopischen Gesichtsfeld grün (monochromatisches Licht!). Wenn man sich überzeugt hat, daß dieser Zustand stationär bleibt, also die Kammer vollkommen dicht ist, dann zieht man den Schieber heraus und läßt gleichzeitig eine Stoppuhr laufen. Im Moment des Herausziehens des Schiebers tritt eine Verlagerung der Schattengrenze ein (siehe Fig. 11) und nach der Zeit t = 1 sieht man, daß die scharfe Spitze der Schattengrenze eine bestimmte Stellung gegenüber der Ausgangslage einnimmt. An einem Okularmikrometer im Mikroskop kann man diesen Weg leicht in seiner wahren Größe messen, wenn man den Nullstrich des Okularmikrometers mit der Anfangsstellung des Schiebers zur Deckung gebracht hat. Im Verlauf der Zeiten t_1, t_2, t_3 usw. wird die Verlagerung der Spitze der Schattengrenze, die

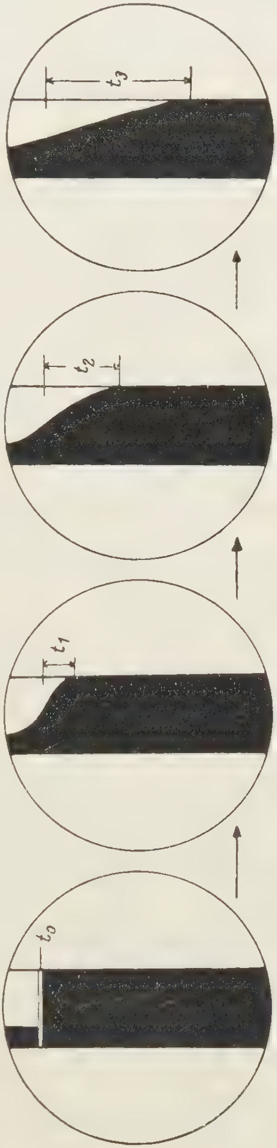


Fig. 11. Schematisches Bild der Mikrokammer bei mikroskopischer Beobachtung. Die Lage des Schiebers zur Zeit t_0 wird als Nullpunkt der mikrometrischen Messung der Verlagerung der Schattengrenze in den Zeiten t_1, t_2, t_3 gewählt (nach Süllmann).

für eine bestimmte Konzentration charakteristisch ist, gemessen, so daß man also die für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten notwendigen Daten, nämlich die Zeit t und den zurückgelegten Weg x direkt bestimmt. Diese Messungen werden für eine Reihe von Konzentrationen durchgeführt, und zwar so, daß man das Prisma sukzessive in die diesen Konzentrationen entsprechenden und aus der Eichkurve bereits vorher bestimmten Winkelstellungen bringt und jedesmal die verschiedenen Weg- und Zeitwerte notiert."

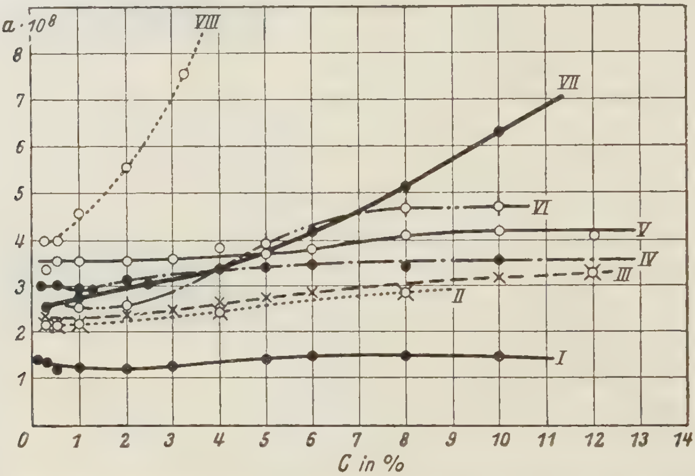


Fig. 12. Graphische Darstellung der Teilchengrößen farbloser Stoffe. Abszisse: Konzentrationen, Ordinate: Teilchenradien, I Harnstoff, II Urotropin, III Lävulose, IV Maltose, V Saccharose, VI Glyzerin, VII Glukose und VIII Laktose (nach Süllmann).

Mit dieser Methode, deren Brauchbarkeit auch für biologische Untersuchungen evident ist, wurden bisher Diffusionskoeffizienten und Teilchengrößen verschiedener Zuckerarten[31]) bestimmt. Die Meßergebnisse, von deren Diskussion hier abgesehen werden kann, zeigt Fig. 12. Wie genau die Ablesungen bei ausreichender Übung vorgenommen werden können, kann die graphische Darstellung eines Meßprotokolls von SÜLLMANN zeigen, wobei die Messung sich auf Saccharose bezieht (Fig. 13).

Es ist klar, daß mit dieser Mikromethode eine außerordentlich große Zahl biologisch wichtiger Stoffe bezüglich Diffusionskoeffizienten und Teilchengrößen ihrer Lösungen untersucht[32]) werden kann, da ja der Brechungsquotient eine sehr empfindliche Konstante darstellt und nach dieser Methode auch einfach gemessen werden kann.

---

[31]) Zuckerarten wurden absichtlich zuerst untersucht, weil sie für viele physiologische Fragen von besonderem Interesse sind.

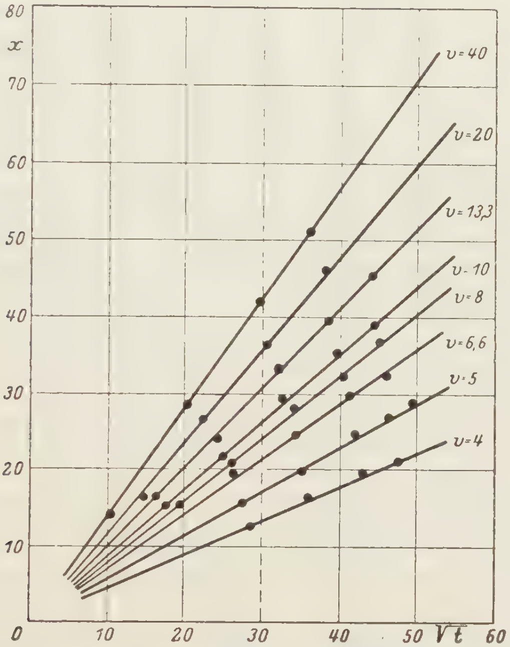


Fig. 13. Graphische Darstellung eines Meßprotokolls ad Saccharose. Abszisse = $\sqrt{t}$, Ordinate: Wege, v4—v40 Verdünnungen (nach Süllmann).

Bei den Methoden zur Bestimmung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten gegen Gase (Luft), bzw. der Grenzflächenspannung zwischen zwei flüssigen, nicht mischbaren Medien begegnen wir wieder den gleichen Verhältnissen, wie sie für die voranstehend erwähnten Faktoren hervorgehoben wurden; auch in diesem Falle scheiden von vorneherein die meisten unter den zahlreichen, ansonst geeigneten Methoden aus, da sie entweder den Forderungen von Mikromethoden nicht entsprechen oder unter biologisch auswertbaren Bedingungen nicht anwendbar sind. Ad Oberflächenspannung will ich hier das Prinzip nur einer Methode[33]) erwähnen, die wir als Mikromethode bezeichnen können, obwohl gerade sie anscheinend bisher nicht ausgewertet wurde.

---

[32]) Wieviel Arbeit noch geleistet werden muß, geht schon daraus hervor, daß mit einer so genauen und einfachen Methode keines der üblichen Gifte oder Arzneimittel in bezug auf seine Dispersitätsverhältnisse untersucht wurde. Ich bin der Meinung, daß mit solchen Messungen manche bisherige Hilfshypothese überflüssig wird.

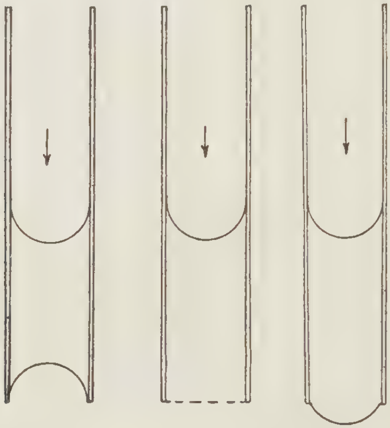


Fig. 14. Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach Ferguson. (Näheres im Text.)

Eine in einer horizontal oder lotrecht gehaltenen Kapillare befindliche sehr kleine Menge einer Flüssigkeit sei bis zu dem einen Kapillarende verlagert und hier durch einen konkaven Meniskus begrenzt. Wird nun am anderen Ende der Kapillare mit Hilfe eines empfindlichen Manometers ein fein regulierbarer Überdruck ausgeübt, so wird der Meniskus allmählich verändert (siehe Fig. 14), erreicht bei ebener Begrenzung einen außerordentlich labilen Gleichgewichtszustand, der bei geringstem Überdruck zur konvexen Form, bei geringstem Sinken des Druckes wieder zur konkaven führt. Bei ebener Begrenzung des Meniskus ist die Oberflächenspannung durch den Überdruck genau ausbalanciert. Bei Kenntnis des Kapillarradius, der Dichte der verwendeten Flüssigkeit und dem Überdruck, der in dem kritischen Zustand ebener Begrenzung des an der Kapillarmündung befindlichen Meniskus herrscht, läßt sich die Oberflächenspannung berechnen.

---

[33]) Siehe Ferguson, A., Transact. of the Faraday Soc., *17*, 1921/22; Proceed. of the physical Soc. of London, *36*, 1923/24.

Mit dieser Methode kann natürlich die Oberflächenspannung viel kleinerer Flüssigkeitsmengen bestimmt werden (z. B. ein 10 bis 50 mm^3) als es mit irgendeiner Modifikation der „Abreißmethoden", der Messung kapillarer Steighöhen, Tropfengewichte oder Tropfenzahl usw. möglich ist.

Sämtliche bisher bekannten Methoden zur Messung der Oberflächenspannung sind aber nur für isolierte Flüssigkeiten anwendbar und es gibt meines Wissens bisher keine, welche die Messung der Grenzflächenspannung, z. B. des Protoplasmas lebender Zellen gegen intrazelluläre Safträume oder gegen das natürliche Milieu (Blut, Liquor usw.) tierischer Zellen gestatten würde.

Unter den Mikromethoden zur direkten Bestimmung elektrischer Konstanten sind die verschiedenen Modifikationen der H-Ionenkonzentrationsmessung[34]) unter Biologen und Medizinern am bekanntesten, obwohl indirekte Methoden (Indikatoren! Mikrokolorimetrie!) viel öfter angewendet werden. Gleiches gilt für die Bestimmung des Ladungssinnes von Kolloiden (Kataphorese einerseits, Fällungs- und Flockungsreaktionen anderseits). Demgegenüber sind z. B. Leitfähigkeitsmessungen relativ wenig ausgenützt. Da gerade die Methoden und Prinzipien der H-Ionenkonzentrationsmessung und ebenso die Kataphoresenmethoden wiederholt[35]) dargestellt wurden, kann ich hier von einer Besprechung einschlägiger Mikromethoden ganz absehen. Die verschiedenen Modifikationen beziehen sich überdies weniger auf verschiedene Prinzipien, sondern zielen auf die Ausarbeitung möglichst handlicher und einfacher Apparaturen, besonders der Elektroden, ab, im anderen Fall auf die Konstruktion geeigneter Beobachtungskammern.

Zur Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit steht heute eine wenigstens im Prinzip einfache Mikromethode[36]) zur Verfügung, die eine Verfeinerung der klassischen Methode von KOHLRAUSCH darstellt. Selbst an 0,05 cm^3 Flüssigkeit können mit einer Genauigkeit von 0,1—0,5% bei konstant gehaltener Temperatur Leitfähigkeitsmessungen ausgeführt werden, und zwar mit der Versuchsanordnung nach Remesow. Bei dieser Methode wird bei doppelter Verstärkung mit Hilfe von Niederfrequenzverstärkung und gleichzeitiger Kompensation von Blindkapazitäten mit variablen Kondensatoren der Strom in der Wheatstone'schen Brücke so verstärkt, daß die Tonminima, die sonst sehr verschwommen sind, mit außerordentlicher Schärfe hervortreten.

---

[34]) MISLOWITZER, E., Die Bestimmung der Wasserstoff-Ionenkonzentration von Flüssigkeiten. Springer, Berlin 1928.

[35]) KELLER und GICKLHORN, J., Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. V, T. II, 1928. Urban und Schwarzenberg, Wien.

[36]) REMESOW, IG., Biochem. Ztschr., *207*, 1929.

Wenig beachtet sind bisher die Mikromethoden zur direkten statischen Potentialmessung[37]) an lebenden tierischen oder pflanzlichen Organen, Geweben, Zellen oder Zellbestandteilen. Obwohl im Prinzip recht einfach, sind Messungen dieser Art in ihrer technischen Ausführung doch außerordentlich heikel und in den Vorbereitungen dazu mühsam, sobald man sich nicht mit relativ groben Methoden begnügt. Die besonderen Schwierigkeiten statischer Potentialmessung liegen darin, daß für einwandfreie Messungen mehrere Bedingungen gleichzeitig erfüllt sein müssen, die sich beziehen:

1. auf die Empfindlichkeit und besondere Eignung des Meßinstrumentes, wobei entweder hochempfindliche Elektrometer (Binant, Quadrant, Einfaden-Elektrometer) verwendet werden müssen oder Galvanometer, die nur als Nullinstrument dienen;

2. auf die Herstellung feiner Mikroelektroden, und zwar entweder Leiter erster Klasse (Wollaston-Draht [Platin] von einigen μ Durchmesser) oder Leiter zweiter Klasse (Kapillaren aus Glas oder Quarz, gefüllt mit leitend gemachten Kolloiden oder gutleitenden Stoffen wie Eiweiß). Die Spitzen dieser Mikroelektroden müssen natürlich eine im Verhältnis zur Größe des zu prüfenden Areals entsprechend kleine Dimension aufweisen;

3. auf die fehlerfreie Ableitung der zu messenden Potentiale, die durch keinerlei Mängel in den Kontakten oder durch unkontrollierbare äußere Ladungen verfälscht sein darf;

4. auf die Hilfsinstrumente (Mikromanipulator), um die Mikroelektroden bei genauer Kontrolle des Ortes der Ableitung, an histologisch oder cytologisch genau bekannte Stellen des Versuchs-

---

[37]) Gicklhorn, J., und Umrath, K., Protoplasma, *4*, 1928. — Nistler, A., und Pekarek, J., Protoplasma, *13*, 1931. Sonderheft. — Ettisch, C., Methodik d. wiss. Biol., II, 1928. Hier weitere Literatur.

objektes anlegen zu können, wobei die Spitzen guten Kontakt gewinnen müssen, ohne daß es zu unphysiologishen Nebenwirkungen (zu starker Druck, Verletzungen, osmotische Wirkungen bei Leitern zweiter Klasse usw.) kommen darf;

5. auf die Überprüfung der Mikroelektroden, die gegeneinander keine oder gar inkonstante Potentialdifferenzen aufweisen dürfen, was bei Herstellung von Elektroden von wenigen μ Durchmesser nicht leicht ist, da schon Spuren von Verunreinigungen störend wirken;

6. auf die Genauigkeit der Messung, die bei den ziffernmäßig meist kleinen Potentialdifferenzen Messungen auf einige Millivolt genau ermöglichen soll.

Ich kann mich hier auf den bloßen Hinweis beschränken, daß derzeit solche Messungen mit ausreichender Genauigkeit wohl möglich sind und für orientierende Untersuchungen besonders dann genügen dürften, wenn es sich nur darum handelt, die verschiedenen Vorzeichen[38]) der Ladung einzelner Gewebe, Zellen oder Zellbestandteile gegenüber einem Bezugspunkt (Erde, Wasser, benachbarte Gewebs- oder Zellbestandteile) und nicht die wahren Werte festzustellen. Es harren aber noch viele grundsätzliche Fragen der Bearbeitung und es muß noch viel rein physikalische Vorarbeit geleistet werden, ehe man die gemessenen Potentiale auch in bezug auf ihre Lokalisation, ihre Entstehung usw. einwandfrei interpretieren kann und damit die elektrische Struktur der gemessenen Elemente selbst kennt[39]).

Nur schlagwortartig will ich erwähnen, daß es auch zu der oft recht aufschlußreichen Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung einige geeignete Mikromethoden gibt, deren Anwendung in biologischen Untersuchungen viel Erfolg verspricht. Ich nenne unter den Ergebnissen, die mit einer[40]) solchen Mikromethode gewonnen wurden, nur die Beobachtung von Svetlov[41]), der an Fischeiern zeigen konnte, daß trotz Milieuänderungen der osmotische Druck des Dotters solange konstant auf einem typischen Wert erhalten bleibt, solange der Embryo lebt; wird dieser getötet, so erfolgt sofort eine beträchtliche Änderung. Das ist um so auffallender, als die Dottermembran für Wasser, manche Elektrolyte, Saccharose und einige Vitalfarbstoffe relativ leicht permeabel ist; trotzdem bleibt ein relativ hoher osmotischer Wert des Dotters auch bei starken Konzentrationsänderungen des umgebenden Milieus erhalten, wenn nur der Embryo lebt, der anscheinend in unbekannter Weise osmo-regulatorisch wirkt.

---

[38]) Dejdar, E., Protoplasma, *13*, 1931. Sonderheft. — Keller, R., Die Elektrizität in der Zelle, II. Aufl., 1925. Kittl's Nachf., Mährisch-Ostrau. — Ferner Arbeiten und Literaturnachweise im Sonderheft der „Arbeitsgemeinschaft“ (Protoplasma, 13. Bd., 1931).

[39]) Darin besteht das Ziel der Bioelektrostatik, die von Keller begründet und von der „Biologisch-physikalischen Arbeitsgemeinschaft im Zoologischen Institut der deutschen Universität Prag“ als spezielles Arbeitsgebiet behandelt wurde.

[40]) Drucker, C., und Schreiner, E., Biol. Zentralbl., *39*, 1913.

Mikromethoden der Spektroskopie, Refraktometrie, Polarimetrie, Interferometrie usw., also optische Methoden, werden von Biologen und Medizinern längst beachtet, sind daher meist besser als Methoden zur Messung mechanischer Eigenschaften bekannt, die ich mit Absicht eingehender berücksichtigt habe, weil sich daran einige prinzipielle Seiten der Mikrophysik einfacher demonstrieren ließen.

Daß besonders elektrische und optische Meßmethoden heute zu hoher Vollkommenheit entwickelt sind, brauche ich wohl nur nebenbei bemerken. Wir sehen hier sogar, daß nicht eine weitere Verfeinerung, sondern eine Verminderung der Empfindlichkeit einen wesentlichen methodischen Fortschritt bedeuten kann, was z. B. die Schlierenmethode nach Emich[42]), verglichen mit Töpler's Methode, demonstrieren kann, wobei überdies Grundsätze der Mikrophysik mit Vorteil beachtet sind.

Ich will die Beschreibung oder die bloße Aufzählung anderer Methoden nicht fortsetzen, um zusammenfassend zu sagen, daß es bereits genug Mikromethoden gibt, die wir als Grundstock einer Mikrophysik ansehen können und die nur einer Zusammenfassung und kritischen Sichtung bedürfen[43]). — Dieser Behauptung muß ich aber einige Bemerkungen hinzufügen, da man leicht einen Widerspruch zu früheren Ausführungen sehen könnte, mit welchen gerade das Fehlen wichtiger Mikromethoden, das mangelnde Interesse und die Schwierigkeiten betont wurden, welche sich dem Ausbau der Mikrophysik entgegenstellen. Ein solcher Widerspruch besteht aber meines Erachtens nicht.

---

[41]) Svetlov, P., Arch. f. Entwickl.-Mech., *114*, 1929.

[42]) Emich, F., Monatshefte der Chemie. Akad. d. Wissensch. Wien (Wegscheider-Festschrift).

[43]) Mit einer solchen Zusammenfassung bin ich selbst beschäftigt und hoffe, in nächster Zeit eine erstmalige Zusammenstellung als „Elemente der Mikrophysik“ vorlegen zu können.

Man darf ja nicht übersehen, daß trotz der großen Zahl doch nur relativ wenige Mikromethoden in der Absicht ausgearbeitet wurden, damit experimentell-biologische oder medizinische Untersuchungen zu fördern. Dazu kommt, daß man wieder nur bei relativ wenigen Mikromethoden die Anwendungsmöglichkeiten und ihre Grenzen auf Grund ausreichend vieler Beobachtungen näher kennt. Weiters wurden viele der bisherigen Methoden nur im Interesse ganz spezieller Fragen geschaffen und mit einer vielfach nur einmaligen Anwendung die Brauchbarkeit im Dienste spezieller Probleme bewiesen. Es ist meines Erachtens vor allem aber ein wesentlicher Unterschied — in dem ich keinen Widerspruch mit früheren Ausführungen sehen kann —, ob man Mikrophysik im Sinne konsequenter Durchführung eines Programms betreibt — das ist hier gemeint — oder ob es nur bei Teilerfolgen bleibt — das ist derzeit der Fall —, die im Hinblick auf das Gesamtproblem nicht von der erwarteten Wirkung sein können. Außerdem fehlt im Sinne unserer Ausführungen meist ein wesentlicher Zug: Es ist die Forderung, daß es sich nicht um Mikromethoden schlechthin handelt, sondern daß damit Probleme der Zellphysiologie bei lokalisierender[44]) Auswertung bearbeitet werden können. Für den Biologen und Mediziner werden diese Ansprüche letzten Endes immer wieder in den Vordergrund treten. Gerade in dieser Hinsicht lassen die meisten mikrophysikalischen Methoden noch viel zu wünschen übrig und so weit ich nach eigener Erfahrung und Literaturstudien urteilen kann, wird auch wenig Anstrengung gemacht, hier mit zielsicheren Arbeiten einzusetzen. Ich muß schließlich noch sagen, ohne aber damit abfällig zu urteilen, daß manche Methode noch einer gründlichen Nachprüfung in bezug auf stillschweigend gemachte Voraussetzungen oder zu wenig beachtete Fehlerquellen bedürfen. Eine solche kritische Sichtung, die entsprechend geschulte Biologen oder Mediziner vornehmen müßten, wird aber nur von programmatisch und zielsicher vorgehenden Arbeiten geleistet werden können. — Es muß aber zugegeben werden, daß viele mikrophysikalische Methoden schon derzeit dem Chemiker gute Dienste leisten können[45]), da er sie ohne derart erschwerende Ansprüche anwenden kann, die bei biologischen Arbeiten leider nicht zu umgehen sind.

---

[44]) Das trifft für sehr viele Mikromethoden zu; als typisches Beispiel nenne ich etwa die BARGER'sche Methode zur Bestimmung des osmotischen Druckes einerseits und die Plasmolysenmethode anderseits.

V.

Abschließend muß ich noch auf einige allgemeine Gesichtspunkte zurückkommen, die mir gerade bei der gegenwärtigen Sachlage geeignet scheinen, die allgemeine Bedeutung mikrophysikalischer Methoden erkennen zu lassen.

Nehmen wir einmal an, wir hätten heute bereits eine Mikrophysik, die der derzeitigen qualitativen und quantitativen Mikrochemie sowohl an Reichhaltigkeit der Methoden und Ergebnisse als auch durch allgemein verbreitete Anwendung annähernd ebenbürtig wäre. Dann liegt die Frage nahe: was ist damit erreicht, das heißt, welche Rückwirkungen kann man von der Anwendung mikrophysikalischer Methoden und der kritischen Auswertung gesicherter Beobachtung erwarten? — Ich meine, daß sich diese Frage schon heute wenigstens in den Grundzügen zutreffend beantworten läßt und stelle Folgendes zur Diskussion:

Ich halte es für sicher, daß zunächst die reine und angewandte Mikrochemie gewinnen kann. Bei der gegenwärtigen Durchdringung von Physik und Chemie, die sich gewissermaßen vor unseren Augen in einem ungeahnten Ausmaß vollzieht, ist leicht einzusehen, daß auch die Arbeitsmethoden beider Disziplinen und nicht bloß die Theorien schließlich viel zu sehr voneinander abhängig sind und bei sinngemäßer Zusammenarbeit voneinander nur ständig neue

---

[45]) Das gilt namentlich für Mikromethoden zur Bestimmung solcher Konstanten, die für den Biologen nicht unmittelbar in Betracht kommen, z. B. Schmelzpunkt, Siedepunkt, Brechungsexponent usw.

Anregungen und Förderungen erfahren müssen[46]). Als Beispiele für Grenzfälle des physikalischen und chemischen Studiums erwähne ich nur die oft recht unübersichtlichen Reaktionsbedingungen in kolloiden, strukturierten Medien, weiters die Aufklärung von Reaktionsabläufen, die ja längst nicht mit rein chemischen, sondern auch mit physikalischen Methoden verfolgt werden, z. B. an Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit. Ebenso können Bestimmungen der osmotischen und elektrischen Eigenschaften, Viskositätsmessungen usw. oft aufschlußreiche Hinweise darüber geben, ob Komplexverbindungen gebildet werden. Auch das Studium der Formänderung von Reaktionsprodukten in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen, z. B. die Änderung sonst typischer Kristallgestalten, dürfte durch physikalische Untersuchungen noch viel Förderung erfahren, wobei die besonderen Vorteile von Mikromethoden evident sind.

Ein positiver Gewinn für die Mikrochemie muß sich ferner damit ergeben, daß die Bestimmung verschiedener, auch für den Chemiker wichtiger physikalischer Eigenschaften wesentlich vereinfacht und erleichtert werden kann, zumindest die mikrophysikalische Untersuchung oft Vorarbeiten leisten kann, die zur ersten Orientierung ausreichen.

Wenn man heute eine Mikrophysik schon zur Verfügung hätte, dann könnte man sicherer als derzeit auch die Ergebnisse der Mikrochemie in ihrer wahren Bedeutung für die Biologie einschätzen. Die Tatsache, daß mikrochemische Methoden heute führend sind, daß sie nahezu alle Erfolge für sich buchen können, daß wesentlich ihre Ergebnisse beachtet und für allgemeine Schlüsse oder für Theorien ausgewertet werden, berechtigt noch nicht dazu, der Mikrochemie unter den zahlreichen anderen Hilfsmethoden[47]) im Dienste biologischer Forschung ein Primat zuzuschreiben.

---

[46]) Das zeigt ein Blick auf die Kolloidchemie und die physikalische Chemie, die heute nicht nur ihre theoretischen Richtlinien, sondern auch ihre Anregungen zum methodischen Ausbau in erster Linie von der Physik beziehen. Vgl. dazu weiters die Ausführungen bei GICKLHORN, Protoplasma, *2*, 1927.

[47]) Eine solche Einseitigkeit im Urteil ist schon deshalb nicht zulässig, weil ähnliche Methoden z. B. die Färbetechniken weniger vom Standpunkt der Mikrochemie als der mikroskopischen Technik betrachtet werden müssen.

Wenn wir aber die Bedeutung der Mikrophysik für die Biologie in den Vordergrund stellen, so halte ich folgende Überlegungen beachtenswert:

Alle Erscheinungen, die der Biologe oder Mediziner an einem bestimmten normalen oder pathologisch veränderten lebenden Objekt experimentell studiert oder beschreibt, sind stets so kompliziert und durch so viele und verschiedene Faktoren bedingt, bzw. von ihnen abhängig, daß man nur mit Skepsis jeden Versuch einer „Erklärung“ betrachten kann, der alles auf wenige Faktoren oder gar nur einen unter ihnen reduzieren will. Jeder Biologe oder Mediziner, der sich längere Zeit ernstlich um die Lösung irgendeines weitergreifenden Problems bemüht hat, bescheidet sich bald damit, weniger zu „erklären“, als vielmehr möglichst genau zu beobachten, die Beobachtungen einfach und eindeutig zu beschreiben, um diese schließlich nur im Sinne ausdrücklich betonter Arbeitshypothesen zu verwerten. Man kann bei diesem Bestreben nicht vielseitig und gründlich genug vorgehen und es ist wohl selbstverständlich, daß auch die physikalische Betrachtungsweise nach Gebühr zu beachten ist. Dabei können Mikromethoden schließlich nicht umgangen werden, da ja der zellige Bau aller Lebewesen unbedingt auch eine Überprüfung und Ergänzung der Befunde bis in mikroskopische Dimensionen erfordert.

Eine unabweisbare Konsequenz dieser Sachlage besteht auch darin, daß man bei jeder Untersuchung, die der Begründung oder Überprüfung irgendeiner Hypothese oder Theorie gilt, die Versuchsbedingungen und den Zustand der Versuchsobjekte möglichst genau und möglichst vielseitig kennen soll. Erst dann ist man ja in der Lage, vergleichbare Versuchsbedingungen herstellen und Änderungen vor, während und nach dem Experiment kontrollieren zu können. Das ist keine übertriebene Forderung, sondern einfach eine Notwendigkeit, die heute bedauerlicherweise viel zu wenig beachtet wird, die aber überflüssige Polemiken beseitigen könnte. Da solche Bestimmungen für den Biologen nur Mittel zum Zweck sind, da ferner die Zahl der zu berücksichtigenden Faktoren groß ist und schon deshalb die erforderliche Vorarbeit — im Sinne des Biologen ist es nicht mehr — rasch und dabei ausreichend genau erledigt sein muß, so können nur Mikromethoden in Betracht kommen. Die Sicherheit und Vielseitigkeit von

Folgerungen, die man dann ziehen kann, ist eine genug wertvolle Kompensation für die natürlich größeren Mühen solcher experimenteller Studien. In der Verringerung des Material-, Zeit- und Arbeitsaufwandes, die sich mit dem zielsicheren Ausbau vorwiegend mikrophysikalischer Methoden von selbst einstellen wird, sehe ich eine der wichtigsten Auswirkungen einer vorgeschrittenen Mikrophysik in der Biologie und Medizin. Daß man dieses Ziel nicht aus den Augen verlieren darf, geht schon daraus hervor, daß mit solchen Untersuchungen physikalischer Faktoren, mit welchen sich der Kolloidchemiker oder Physiker begnügen kann, für den Biologen und Mediziner recht wenig gedient ist. Ihnen handelt es sich ja darum, eben verwendete Lösungen, eben herrschende Versuchsbedingungen, eben gegebene Zustände des Versuchsobjektes usw. zu kennen und nicht ganz allgemeine physikalisch-chemische Beziehungen[48]).

Es scheint mir in diesem Zusammenhang auch der ausdrücklichen Betonung wert, daß gerade die Physik bis heute unter allen anorganischen Disziplinen — soweit sie für die Biologie in Betracht kommen — den geringsten Kontakt mit der Morphologie, Histologie oder Cytologie gefunden hat, deren wichtige Stellung im Rahmen der allgemeinen Biologie nicht bloß aus ihrer Geschichte hervorgeht. Eine biologisch auswertbare Mikrophysik dürfte unter diesen Umständen noch am ehesten geeignet sein, diesen notwendigen Zusammenschluß anzubahnen und zu fördern[49]).

Man wird weiter bedenken müssen, daß wir heute eine große Zahl physiologischer Erscheinungen kennen, für welche sicher bestehende physikalische Änderungen neben morphologischen oder chemischen nahezu unbekannt sind. Man wird aber meines Erachtens keinen plausiblen Grund zur Annahme finden können, daß physikalische Vorgänge, Zustände und Kräfte weniger charakteristisch oder weniger wichtig sein sollten als morphologische und chemische Veränderungen. Man weiß längst, daß physikalische Veränderungen oft viel früher und leichter als irgendwelche anderen die Initialstadien von Vorgängen erkennen lassen, die erst in ihren Endeffekten auffallend sind. Man denke z. B. an das elektrische Verhalten, das heißt Auftreten, Größe und Art der Verteilung elektrischer Ströme und Potentialänderungen während des Erregungsvorganges in Muskeln oder Nerven. Ich erwähne dieses Beispiel absichtlich, weil sich gerade daran zeigen ließe, daß bloß durch den Mangel an Mikromethoden bestimmte, der makroskopischen Untersuchung leicht zugängliche Objekte gewählt werden mußten, während andere, sicher nicht minder beachtenswerte Versuchsobjekte (Generationszellen, Drüsen usw.) bis vor kurzem selten oder überhaupt nicht verwendet wurden, bzw. nicht verwendet werden konnten[50]).

---

[48]) Darauf kann heute nicht oft und nachdrücklich genug hingewiesen werden, denn gerade in der Nichtbeachtung dieser Umstände liegt die allgemeine Quelle der Willkür und Einseitigkeit bei der Theorienbildung. Es wäre aber schon heute möglich, diese Forderungen zu erfüllen.

[49]) Eine solche Hoffnung ist um so berechtigter, als heute eine vielleicht einmalige Gelegenheit dazu geboten ist, da besonders durch WEBER's organisatorische Arbeiten die Protoplasmaforschung rapid wächst und mikrophysikalische Methoden dabei besonders beachtet werden.

Die mikrophysikalische Analyse muß aber auch geeignet sein, solche Veränderungen im biologischen Milieu aufzudecken, die mit mikrochemischen Methoden heute noch gar nicht faßbar sind oder bei welchen chemische Veränderungen derart geringfügig sein dürften, daß sie nur schwer nachgewiesen werden können. Ich erinnere weiters an Fälle, bei welchen festgestellt ist, daß physikalische Änderungen am lebenden Objekt mit bestimmten morphologischen und physiologischen Vorgängen innig verbunden sind. Ein typisches Beispiel soll das zeigen:

Bei der Reifung des Eies tierischer Organismen, ebenso bei der der Befruchtung und nachfolgenden Furchung spielen sich überaus markante Vorgänge am Zellkern ab, die hier nicht näher beschrieben werden können. Es muß der Hinweis genügen, daß sie mit geringfügiger Variation für das ganze Tierreich typisch sind und die Klarstellung der Bedeutung und Phasen dieser Kernveränderungen zu den wichtigsten Erfolgen der Cytologie gerechnet werden kann. Man hat natürlich längst vermutet, daß auch im Protoplasma von Eizellen bei der Reifung, Befruchtung und Furchung Änderungen erfolgen müssen, doch hat man bis in die letzten Jahre darüber mehr spekuliert als experimentiert. Es ist nun sehr bemerkenswert, daß während der Kernteilung, während der Abstoßung der „Polkörperchen“ und während der Furchung überaus charakteristische Änderungen der Viskosität[51]) erfolgen und daß diese Viskositätsänderungen in ihrem zeitlichen Verlaufe so auffallende Beziehungen zu den morphologisch sichtbaren Vorgängen erkennen lassen, daß wohl kausale Zusammenhänge bestehen müssen. Wir wollen dabei die Frage offen lassen, was Ursache oder Folge bei diesen Vorgängen ist. Aus Fig. 15 ist

---

[50]) Darauf hat namentlich KELLER immer wieder hingewiesen. (KELLER, Die Elektrizität in der Zelle l. c., Biologische Hochspannungsversuche [Zusammenfassung von Artikeln in der Biochem. Ztschr.] Springer, Berlin 1928.)

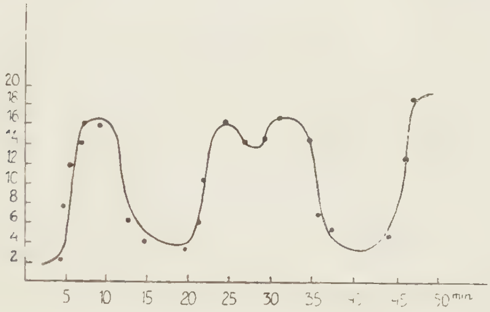


Fig. 15. Veränderungen der Viskosität des Protoplasmas der Eier von Cumingia während der Ausstoßung der Polkörperchen und nachfolgenden Zell- bzw. Kernteilung. Abszisse: Zeiten, Ordinate: relative Viskosität (nach Heilbrunn).

ersichtlich, daß die Viskosität während der Bildung und Abstoßung der 1. Polkörperchen beträchtlich ansteigt, im Verlauf von zirka 10 Minuten wieder auf den ursprünglichen Wert fällt, bei der Abstoßung der 2. Polkörperchen wieder denselben hohen Wert erreicht, um nach weiteren 10 Minuten noch einmal auf einen typischen Normalwert zu fallen und schließlich bei der mitotischen Teilung neuerlich ansteigt. Wir sehen also, daß konstante und typische morphologische Veränderungen mit ebenso konstanten und typischen Änderungen einer physikalischen Eigenschaft verknüpft sind, wobei man in diesem Fall die morphologischen Verhältnisse längst genauer kennt. Nehmen wir einmal an, daß zuerst die physikalischen Veränderungen und nicht die morphologischen bekannt wären. Wenn man dann früher oder später mit anderen Methoden nach Begleiterscheinungen dieser physikalischen Veränderungen suchen würde, darunter auch morphologischen, dann müßte man ebenso sicher die auffälligen Kernveränderungen finden, wie man in unserem konkreten Fall bei entgegengesetztem Weg die typischen Viskositätsänderungen finden mußte. Sobald der Blick für Beobachtungen geschärft ist und unter Auswertung geeigneter Methoden die Aufmerksamkeit sich auf bestimmte Erscheinungen konzentriert, dann können an sich oft kleine Beobachtungen in ihrer wahren Bedeutung erst erkannt oder bis dahin unbekannt gebliebene Zusammenhänge aufgedeckt werden.

---

[51]) Heilbrunn, L. V., Quaterl. Rev. of biol., *2*, 1927. — Journ. of exp. zool., *34*, 1921. — Diesem Autor verdankt man auch die derzeit beste kritische Zusammenfassung der Methoden, Probleme und Ergebnisse von Studien zur Viskosität des Protoplasmas.

Die Aufzählung dieser wenigen, willkürlich herausgegriffenen Gesichtspunkte muß ausreichen, denn es ist die Beweiskraft von Argumenten nicht von ihrer Zahl abhängig. Außerdem muß ich es ja schließlich doch jedem einzelnen unter Ihnen überlassen, sich selbst ein Urteil darüber zu bilden, ob die einleitend aufgestellte Behauptung von der Notwendigkeit, Dringlichkeit und Fruchtbarkeit einer Mikrophysik in der Biologie und Medizin nicht bloß meiner persönlichen Überzeugung nach, sondern sachlich begründet zu Recht besteht.

SAMMELREFERAT.

METHODEN DER FLUORESZENZANALYSE.

Von

MAX HAITINGER.

(Wien.)

(Eingelangt am 18. November 1931.)

I. Einleitung.

Durch die Fluoreszenzanalyse, die bisher fast ausschließlich auf makroskopische Beobachtung begründet ist, wurden Substanzmengen erfaßt, die ihrer Größenordnung nach in das Gebiet der Mikrochemie fallen. Bei mikroskopischer Beobachtung — namentlich bei Verwendung eines lichtstarken Fluoreszenzmikroskops — dürften sich die Erfassungsgrenzen noch weiter heruntersetzen lassen[1]).

Hierzu werden jene Methoden, die sich bei der makroskopischen Untersuchung bewährt haben, den geänderten Verhältnissen entsprechend modifiziert werden müssen, zum Teil werden sie sich aber auch direkt auf die Mikroskopie übertragen lassen. Sie sollen daher in den folgenden Zeilen kurz dargestellt werden.

Hierbei konnten natürlich nicht auf all die zahlreichen Arbeiten über Fluoreszenzerscheinungen auf dem Gebiete der Technik, Lebensmitteluntersuchung, Pharmakognosie, Biologie und Kriminalistik eingegangen werden; es sind vielmehr nur jene Arbeiten referiert, in denen sich Winke finden, die für die Entwicklung der Methodik von Wichtigkeit sind. Für eine Orientierung über die Nutzanwendung auf einem Spezialgebiet sei auf die Monographie von P. W. DANCKWORTT[2]) verwiesen.

---

[1]) Vgl. hierzu M. HAITINGER, FR. FEIGL u. A. SIMON, Mikrochemie, **X**, 117 (1931).

[2]) Die Lumineszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht. 2. Aufl. Leipzig 1929. Akadem. Verlagsgesellschaft.

II. Lichtquellen.

Als solche können alle jene verwendet werden, welche reich an ultravioletten Strahlen sind. Für die makroskopische Beobachtung großer Flächen eignet sich die Quecksilberdampflampe mit ihrer großen Längenausdehnung und ihrer großen Gesamthelligkeit recht gut. Für mikroskopische Untersuchungen braucht man eine mehr punktförmige Lichtquelle großer Flächenhelligkeit. In dieser Beziehung ist der elektrische Flammenbogen der Quecksilberdampflampe weit überlegen. Um bei Verwendung von Kohlenelektroden den Ultraviolettreichtum des Lichtbogens zu erhöhen, hat man Kohlen, die mit Eisen-, bezw. Nickelsalzen imprägniert sind, verwendet. Den größten Ultraviolettreichtum liefern aber Lichtbogen, die zwischen Metallelektroden übergehen, wie sie von E. Tiede und Fr. Goldschmidt[3]) für makroskopische Beobachtung lichtschwacher Präparate und von M. Haitinger[4]) für mikroskopische Untersuchungen verwendet wurden.

Die Lichtquelle wird in ein lichtdichtes Gehäuse eingeschlossen, das an passenden Stellen mit Schwarzglasfiltern versehen ist (Analysenlampe). Diese Filter (UG_1 oder UG_2 von Schott und Genossen oder das Ultraviolettfilter der Sendlinger Optischen Werke usw.) sind für das Ultraviolett zwischen 3000 und 4000 Å. E. durchlässig, während sie das sichtbare Licht bis auf einen kleinen Anteil im Rot absorbieren. Da letzteres Rotfluoreszenz vortäuschen könnte, wo eine solche in Wirklichkeit nicht vorhanden ist, muß das Licht noch in passender Weise durch eine Kupfervitriollösung solcher Konzentration, daß das Rot vollkommen verschwindet, gefiltert werden. Man beobachtet also im filtrierten ultravioletten Licht (auch Woodlicht genannt).

Linsen, die zur Konzentration des Lichtes dienen, müssen aus quarz- oder ultraviolettdurchlässigem Glas sein. Bei der Quecksilberdampflampe wird auch ein Lichtkonzentrator verwendet, das ist ein Spiegel mit einem Konzentriertrichter aus Metall, der das Licht auf eine kleine Fläche zusammenzieht. In einfacher Weise kann derselbe Effekt durch einen mit verdünnter, klarer Kupfersulfatlösung (1 Tropfen Salzsäure zusetzen) gefüllten, dünnwandigen Glaskolben (Schusterkugel) erreicht werden (M. HAITINGER[5]).

---

[3]) B., **62**, 758 (1929).

[4]) Mikrochemie, **IX**, 430 (1931).

III. Direkte Beobachtung.

1. *Allgemeines.*

Das Naheliegendste ist, die Präparate ohne jegliche Vorbereitung, also direkt unter der Lampe zu beobachten.

Viele Autoren haben sich auch anfänglich damit begnügt; bald hat sich gezeigt, daß die Analysenlampe denn doch keine „mühelose" Untersuchung ermöglicht, und es wurde zunächst eine Reihe von Kunstgriffen angewendet, um die Fluoreszenzerscheinungen deutlicher und sinnfälliger zu machen, woraus sich allmählich eine Methodik des Arbeitens entwickelt hat.

Zunächst zeigen sich Farbunterschiede, je nachdem die Untersuchung auf schwarzer oder auf weißer Unterlage durchgeführt wird: schwarz erscheint im Ultraviolett oberflächlich oxydiertes Kupfer, wie man es erhält, wenn man ein Kupferblech durch die Flamme eines Bunsenbrenners zieht, ferner schwarzer Wollsamt oder schwarzes Mattpapier; Glanzpapier oder schwarz lackiertes Blech geben störende Reflexe; Tonplatten und Porzellangefäße zeigen immer eine bräunliche, bezw. dunkelviolette Fluoreszenz und sind daher nicht geeignet. Als weiße Unterlage verwendet man Filtrierpapier, das man einige Minuten mit unfiltriertem Licht bestrahlt, wodurch es seine meist bläuliche Fluoreszenz verliert und unter der Lampe rein weiß erscheint (M. HAITINGER u. V. REICH[6]).

Flüssigkeiten beobachtet man in dünnwandigen Eprouvetten oder Bechergläsern; sie sind für das in Betracht kommende Ultraviolett hinreichend durchlässig (J. EISENBRAND[7]) und machen die teuren Quarzgefäße unnötig; das Glas der Geräte darf nur nicht selbst fluoreszieren. Viele Gläser zeigen eine gelbgrüne Fluoreszenz, die jener der Uranylverbindungen nicht unähnlich ist, andere fluoreszieren rötlich.

Jenaer Geräteglas, Duran, Suprax, Bohemia Cavalier, Wiener Geräteglas und einige Thüringer Glassorten sind für die Beobachtung von Fluoreszenzuntersuchungen geeignet (M. HAITINGER, H. JÖRG und V. REICH[8]).

---

[5] Mikrochemie, **VIII**, 81 (1930).

[6] Ztschr. angew. Chem.,**27**, 982 (1928).

[7] Pharmaz. Ztschr., **74**, 263 (1929).

[8] Ztschr. angew. Chem., **41**, 815 (1928).

Für besonders schwache Fluoreszenzen werden Geräte aus ultraviolettdurchlässigem Glas verwendet; dieses ist in den besten Qualitäten bis 2500 Å. E. durchlässig. Allerdings nimmt die Durchlässigkeit bei längerer Einwirkung von ultraviolettem Licht ab, erreicht aber nach zirka 20stündiger Bestrahlung einen Grenzwert, der bei den guten Sorten, beispielsweise beim Osram- oder Schott'schen Glas, um 15 bis 20% niedriger ist als der Wert der anfänglichen Durchlässigkeit. Diese Abnahme der Durchlässigkeit wirkt sich aber bei dem hier in Frage kommenden Wellengebiete nicht vollkommen aus, da sie hauptsächlich durch das kurzwelligere Ultraviolett verursacht wird. Sie wird bewirkt durch die Reoxydation des Eisens, das in der niedrigsten Oxydationsstufe vorliegen muß (A. RUTTENAUER⁹), D. STARKIE und W. E. S. TURNER¹⁰), P. DAWIDOWITSCH¹¹), A. R. WOOD und M. N. LEATHWOOD¹²). Gläser, die 92 bis 94% des Eisens als Eisenoxydul enthalten, sollen nach W. E. S. TURNER¹³) keine Veränderung durch Bestrahlung erleiden. Durch Erhitzen des Glases auf 400 bis 500° kann die ursprüngliche Durchlässigkeit wieder erreicht werden (W. E. S. TURNER, C. C. NITCHIE und F. C. SCHMUTZER¹⁴). Der Einfluß der Hitze ist der Wirkung der ultravioletten Strahlen entgegengesetzt (A. LECERNIER und P. GILLARD¹⁴ᵃ). A. R. WOOD und M. N. LEATHWOOD¹⁵) empfehlen zu demselben Zweck Bestrahlung mit Sonnenlicht oder mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe, das durch gewöhnliches Fensterglas gefiltert wird.

Für vergleichende Versuche auf Farbe und Intensität verwende man Gefäße von der gleichen Glassorte, Form und Dimension.

Peinlichste Reinlichkeit der Gefäße, die in Chromschwefelsäure gereinigt werden müssen, ist dringend notwendig. Vor ihrer Benützung müssen sie auf Reinheit im Ultraviolett geprüft werden,

---

⁹) Sprechsaal, **61**, **449** (1928).

¹⁰) Journ. Soc. Glass Technol., **12**, 336 (1928).

¹¹) Journ. Opt. Soc. America, **20**, 627 (1930).

¹²) Nature, **125**, 351 (1930).

¹³) Journ. Soc. Chem. Ind., **48**, 65 (1929).

¹⁴) Science, **71**, 590 (1930).

¹⁴ᵃ) Rev. universelle mines, **4**, 349 (1930).

¹⁵) Nature, **124**, 441 (1929).

in dem Verunreinigungen sichtbar werden, die im gewöhnlichen Lichte nicht wahrgenommen werden können.

Reagenzien sind vor Licht und Luft geschützt aufzubewahren; unnötiges Öffnen der Flaschen und Pulvergläser ist zu vermeiden, weil viele in reinem Zustande optisch leere Stoffe unter dem Einflusse der Laboratoriumsluft Blaufluoreszenz annehmen, eine Beobachtung, die S. J. Wawilow und L. F. Tummermann[16]) an Wasser, Schwefelsäure, Alkohol, Äther, Aceton, Benzol, Toluol, Xylol, Amyl- und Isoamylalkohol, Glycerin, Chloroform, Kohlenstofftetrachlomid, Butylalkohol, Essigsäure, Rizinusöl und anderen Stoffen gemacht haben. Nachdem die Fluoreszenzspektren aller dieser Flüssigkeiten einander sehr ähnlich sind (sie zeigen alle ein Maximum in der Gegend von 400 bis 420 mμ), vermuten die genannten Autoren, daß diese Blaufluoreszenz derselben Ursache, wahrscheinlich der Einwirkung des Luftsauerstoffes oder der Kohlensäure der Luft, zuzuschreiben ist.

Kork und Kautschuk sind als Stöpsel und Verbindungsstücke nicht brauchbar, da Flüssigkeiten bei Berührung mit ihnen eine fluoreszierende Substanz herauslösen (R. Rüdiger und E. Mayer[17]): vorteilhaft werden Korkstöpsel mit Stanniol umwickelt.

2. *Feste Stoffe.*

Feste Stoffe werden zunächst in ganzen Stücken, womöglich an einer frischen Bruchfläche, dann aber auch in Pulverform beobachtet; man nimmt oft beim Pulver andere Farben wahr, als bei der Beobachtung eines ganzes Stückes, so z. B. bei Mineralien, wie Kalkspat, Gips, Baryt usw. (A. Eibner, L. Wiedemayer und A. Stois[18]), oder bei Harzen (H. Wolff und W. Toeldte[19]) usw.

Salsenartige Substanzen, wie Fette oder andere halbfeste Stoffe, werden auch, in dünner Schicht, etwa auf einer Glasplatte, aufgestrichen, beobachtet; man erkennt dann oft viel feinere Farbenunterschiede als bei der Beobachtung in dicker Schicht (M. Haitinger, H. Jörg und V. Reich, l. c.).

Zur Untersuchung der Porosität fester Substanzen, des Verwitterungszustandes von Gesteinen oder der Eindringungstiefe von

---

[16]) Ztschr. Physik, **54**, 217 (1929).

[17]) Ztschr. Unters. Lebensmittel, **57**, 651 (1929).

[18]) Farbenztg., **31**, 2399 (1926).

[19]) Ebenda, **31**, 2503 (1926).

Imprägnierungsmitteln in Baumaterialien hat A. SCHMÖLZER[20]) das Material mit viskosem Maschinenöl oder mit Fluoreszeinlösung getränkt und dann an der frischen Bruchfläche beobachtet; ein ähnliches Verfahren verwenden G. TESTI und G. INARDI[21]) zur Untersuchung bituminöser Gesteine. O. KRAUSE[21a]) schlägt die Imprägnierung von Tonen und Kaolinen mit schwach fluoreszierenden Chemikalien vor, um kolloid strukturelle Eigentümlichkeiten derselben deutlicher sichtbar zu machen.

Manche Stoffe, wie z. B. Bariumplatincyanür, fluoreszieren nur in fester Form. Die weitaus größere Anzahl von Stoffen scheint sich umgekehrt zu verhalten; Fluoreszein, Eosin, Naphthalinrot, Resorcin werden als nicht fluoreszierend beschrieben, fluoreszieren aber in geeigneten Lösungsmitteln (W. LENZ[22]); unter der Quarzlampe konnte auch tatsächlich an diesen Präparaten im festen Zustand keine Fluoreszenz beobachtet werden, auch nicht in feiner Verteilung, was A. REIMANN[23]) versuchte, der Fluoreszein und Eosin am Objektträger auskristallisieren ließ. Dagegen hat P. BALAVOINE[24]) beobachtet, daß Auramin, das weder fest noch in Lösung fluoresziert, leuchtende Pünktchen erkennen läßt, wenn man es durch Eindampfen in fein verteiltem Zustande gewinnt. Dies hat mich veranlaßt, auf diese Weise am Objektträger gewonnenes Fluoreszein und Umbelliferon mit dem von mir in dieser Zeitschrift beschriebenem Fluoreszenzmikroskop (l. c.) im Eisenbogen zu untersuchen; ich konnte nicht nur eine deutlich grüngelbe Fluoreszenz beim Fluoreszein und eine blaue beim Umbelliferon bei visueller Betrachtung erkennen, sondern ich konnte die Kristalle auch mit einer Expositionszeit von zwei Minuten im Fluoreszenzlichte photographieren. Es scheint also — da auch Eosin in fein verteiltem Zustande, wenn auch viel schwächer, fluoresziert als Fluoreszein und Umbelliferon — der Verteilungsgrad von Einfluß für die Fluoreszenz zu sein[25]). Dies würde auch die später erwähnte „Faserfluoreszenz“ sowie die Beobachtung von A. EIBNER[26]) erklären, derzufolge die Fluoreszenz des Zinkoxyds eine Funktion der Teilchengröße ist; nach ihm fluoreszieren hochdisperse Sorten kanariengelb, spezifisch schwerere gelbbraun.

---

[20]) Die Steinindustrie, 1927, Heft 12, Mitteilung. d. Staatl. Techn. Versuchsamtes, Wien, **17**, 104 (1928).

[21]) Ann. chim. appl., **17**, 446 (1927).

[21a]) Keramos, **9**, 4 (1930).

[22]) Ztschr. analyt. Chem., **54**, 27 (1915).

[23]) Ann. d. Phys. (4), **80**, 43 (1926).

[24]) Arch. Sciences phys. nat., **5** (12), Heft 62 (1930).

[25]) Bisher nicht veröffentlicht.

Andere Stoffe, wie beispielsweise das Uranylnitrat (W. LENZ, l. c.) oder das Kreatinin (G. REIF[27]), fluoreszieren in Lösung stärker als in fester Form; doch scheint dies der seltenere Fall zu sein. Endlich ändern viele Stoffe mit dem Aggregatzustande die Fluoreszenzfarbe. So fluoresziert ganz reines Anthrazen in Kristallen leuchtend weiß mit hellblauem Schimmer, verflüssigt erscheint es farblos, als Dampf dagegen tiefviolett, in Alkohol, Äther, Benzol, Toluol, Chloroform usw. gelöst ebenfalls violett.

Es ergibt sich aus dem Beispiele des Anthrazens die Notwendigkeit, vorliegende Proben in den verschiedenen Aggregatzuständen zu untersuchen.

Bei vielen scheinbar einheitlichen Stoffen ist zu bedenken, daß die Fluoreszenz sehr oft durch eine geringe Menge eines Fremdatoms verursacht wird und daher keine charakteristische Eigenschaft der betreffenden Substanz ist. So fluoresziert beispielsweise reines Kalziumfluorid nicht, während die meisten natürlichen Flußspate eine blaue, mitunter auch eine rote Fluoreszenz zeigen, die auf die Anwesenheit von Spuren seltener Erden zurückzuführen ist; ähnliche Erscheinungen können bei vielen Mineralien beobachtet werden.

Die Fluoreszenz der Kalkspate wird meist als rosenrot bis gelbrot beschrieben; ich sah solche von zartestem Rosa bis zum feurigsten Rot leuchten, während reiner isländischer Doppelspat unter der Lampe farblos und durchsichtig erscheint wie im Tageslicht[28]).

In diesem Zusammenhange sei noch die Arbeit von S. DUTT[28a]) erwähnt, der die Beobachtung machte, daß manche organische Substanzen (Chinin, Resacetophenon, Anthrazen, Eosin, Fluoreszein usw.) ihre Fluoreszenz verlieren, wenn sie hinreichend gereinigt werden; sie kehrt aber unter dem Einfluß der Laboratoriumsluft, oder wenn man das Präparat bis zum Schmelzpunkt erhitzt oder oxydierenden Agenzien aussetzt, mehr oder weniger rasch zurück. Dies würde die Vermutung rechtfertigen, daß die Fluoreszenz überhaupt nur durch Spuren von Verunreinigungen verursacht oder ausgelöst wird. Allerdings geht aus den Angaben DUTT's nicht klar hervor, ob die gereinigten Präparate unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes schwarz, also unsichtbar, sind oder ob sie in jener Farbe aufleuchten, in der sie im gewöhnlichen Lichte erscheinen; es scheint mir fast, als ob letzteres gemeint ist. Aber auch in diesem Falle werden Strahlen in solche anderer Wellenlänge umgewandelt, es liegt also wieder Fluoreszenz vor. Beim Anthracen habe ich selbst die Beobachtung gemacht, daß seine Fluoreszenz bei fortschreitender Reinigung durch Umkristallisieren in leuchtendes, schwach blaustichiges Weiß übergeht. Unter den untersuchten Stoffen befinden sich auch Eosin und Fluoreszein, bei denen man im festen Zustande — wenigstens makroskopisch — überhaupt keine Fluoreszenz erkennen konnte (vergl. Seite 263).

---

[26]) Chem.-Ztg., **55**, 593, 614 (1931).

[27]) Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel, **58**, 28 (1929).

[28]) M. HAITINGER, Mitteilungen des Technischen Versuchsamtes, Wien, **17** 147 (1928).

[28a]) Journ. Indian Soc., **7**, 505 (1930), C. **1930**, II, 3002.

3. Lösungsmittel.

Als Lösungsmittel dürfen nur solche verwendet werden, die in jenem Bereiche, für welche das verwendete Filter durchlässig ist, kein Ultraviolett absorbieren, also in diesem Lichte farblos erscheinen wie im gewöhnlichen Licht. Wiederholt destilliertes Wasser, Äthyl-, Methyl-, Amylalkohol, Äther, Petroläther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Aceton, Äthylacetat, Essigester, Benzol und Toluol sind geeignet und von verschiedenen Autoren verwendet worden. Doch zeigen fast alle Handelsprodukte eine mehr oder weniger intensiv blaue oder blaugraue Fluoreszenz (vgl. WAWILOW und TUMMERMANN, Seite 362); diese kann in den meisten Fällen durch eine ein- oder mehrmalige Destillation beseitigt werden, bei der man den Vorlauf und einen Rückstand von etwa 15% der gesamten Flüssigkeitsmenge nicht verwendet (M. HAITINGER, H. JÖRG und V. REICH[29]). Glycerin, das in der Regel, aber nicht immer, und bei verschiedenen Proben auch mit verschiedener Intensität blau fluoresziert, kann durch Destillation von seiner Fluoreszenz nicht befreit werden. Dagegen gelingt es, durch mehrmalige Behandlung mit reinster Tierkohle, den fluoreszierenden Bestandteil des Glyzerins, der demnach als eine Verunreinigung desselben zu bezeichnen ist, nahezu vollständig zu beseitigen[30]). Es darf natürlich nur solche Kohle zu Reinigungszwecken verwendet werden, die selbst keine fluoreszierende Substanz an Lösungsmitteln abgibt. Als solche haben J. WERDER und C. ZÄCH[31]) carbo animalis. puriss. sicc. MERCK angegeben.

---

[29]) L. c. und Fortschritte d. Landwirtsch., **3**, 433 (1928).

Nicht selten zeigt dieselbe Substanz in verschiedenen Lösungsmitteln verschiedene Fluoreszenz, so beispielsweise das von H. LEY und W. FISCHER[32]) untersuchte Aminochlormaleinimid, das in Wasser kaum, in Alkohol gelbgrün, in Äther blaugrün fluoresziert. In anderen Fällen wieder ändert sich die Intensität mit der Natur des Lösungsmittels: so fluoreszieren Uranin, Rhodamin und Fluoreszenzblau in Aceton, Alkohol, Acetaldehyd und Essigester sehr stark, in Glycerin mittelstark, in Chloroform und Pyridin sehr schwach (S. LÉPINE[33]). Nach F. KEHRMANN, H. GOLDSTEIN und F. BRUNNER[34]) verschieben Lösungsmittel mit kleiner Molekularrefraktion nach längeren, solche mit großer Molekularrefraktion nach kürzeren Wellenlängen; dagegen wirken Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstante farbvertiefend, solche mit kleiner Dielektrizitätskonstante farberhöhend; ihre Untersuchungen bezogen sich auf Amidocarbazone; ähnliche Verhältnisse findet man auch bei anderen Verbindungen, doch dürfen daraus noch keine generellen Schlüsse gezogen werden, da auch Fälle mit entgegengesetztem Verlauf bekannt sind[35]).

Bei der Untersuchung von Harzen haben H. WOLFF und W. TOELDTE[36]) auch empfohlen, das Lösungsmittel wieder auszutreiben und den Verdampfungsrückstand zu untersuchen.

4. *Flüssigkeiten.*

Flüssigkeiten und Lösungen von festen Stoffen in solchen werden in dünnwandigen Eprouvetten oder Bechergläsern, und zwar sowohl in auffallendem als auch in durchfallendem Licht, sowie senkrecht zur Einfallsrichtung des Lichtes untersucht. Die Fluoreszenzfarbe, die man in letzterem Falle wahrnimmt, deckt sich zumeist mit jener im auffallenden Licht, erscheint aber meist reiner und intensiver als in diesem. F. Croner[37] verwendet für die Beobachtung von Ölen Petrischalen und beobachtet dabei nur die fluoreszierende Oberfläche. H. Marcelet[38] empfiehlt, viskose Flüssigkeiten über eine geneigte Glasplatte, die mit einem schwarzen Grund unterlegt ist, herabfließen zu lassen, um ihre reine Fluoreszenz beobachten zu können. Wirklich ungetrübte Fluoreszenzfarben sieht man nur dann, wenn man das Licht senkrecht auf die Oberfläche der Flüssigkeit auffallen läßt und seitlich einfallendes Licht von der Probe abhält. Dies kann auf einfache Weise erreicht werden, indem man die Eprouvette, die die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, derart in schwarzes Papier einhüllt, daß ein etwa 3 bis 5 mm breiter Spalt für die Beobachtung offen bleibt. Für strengere Untersuchungen dieser Art sind von M. Haitinger und V. Reich[39] und in etwas modifizierter Form von W. Teuscher[40] und H. Ivekovic[41] einfache Anordnungen, die in die Analysenlampe eingebaut werden können, verwendet worden. Bei horizontal einfallendem Licht beobachtet man in diesem Falle die Flüssigkeit von oben her in einem parallelipipedischen Glastrog, dessen Boden und Seitenwände gegen einfallendes Licht abgedeckt sind; die der Lichtquelle zugewendete Fläche muß mit ultraviolettdurchlässigem oder möglichst dünnem Glas (Deckglas) abgeschlossen werden. Man kann auch bei dieser Beobachtungsmethode aus der Tiefe, bis zu der die Fluoreszenz reicht, sowie aus dem Umstande, daß bei zunehmender Verdünnung die Intensität abnimmt, bis zu einem gewissen Grade durch Vergleiche auf die Konzentration einer vorliegenden Probe schließen.

---

[30]) Bisher unveröffentlicht.

[31]) Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene, **19**, Heft 2/3 (1928).

[32]) B., **46**, 327 (1913).

[33]) Ann. Phys. (9), **4**, 207 (1915).

[34]) Helv. chim. Acta, **9**, 222 (1926).

[35]) Vgl. P. PRINGSHEIM, Fluoreszenz und Phosphoreszenz, 3. Aufl., S. 222.

[36]) Farbenztg., **31**, 2503 (1926).

Die Empfindlichkeit ist oft eine sehr große; so konnte A. F. Kitsching[42] Chinin, Äskulin und Uranin in Verdünnungen $1 : 10^8$, bezw. $1 : 10^9$ und $1 : 10^{10}$ nachweisen.

---

[37] Ztschr. angew. Chem., **39**, 35 (1926).

[38] Compt. rend. Acad. Sciences, **186**, 226 (1927).

[39] Die chem. Fabrik, **3**, 379 (1929).

[40] Ebenda, **3**, 53 (1930).

[41] Ztschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, **112**, 54 (1931).

[42] Analyst, **47**, 206 (1922).

Anthrazen in Benzol konnte ich noch bei einer Verdünnung $1 : 10^{8}$ erkennen. Auffallend ist, daß das Anthrazen auch an Wasser, in dem es ja als unlöslich gilt, eine blaue Fluoreszenz abgibt[43]). Noch weiter kommt man, wie bisher noch nicht veröffentlichte Versuche gezeigt haben, wenn man im vollkommen verdunkeltem Raume mit dunkel adaptiertem Auge beobachtet und das Licht einer außerhalb des Beobachtungsraumes aufgestellten Lichtquelle in geeigneter Weise, etwa durch ein Kondensorsystem, auf die Oberfläche der Flüssigkeit leitet. Man gelangt dabei auch bei viel schwächer fluoreszierenden Flüssigkeiten als den oben angeführten, beispielsweise Salicylsäurelösungen, bis zu Verdünnungen $1 : 10^{9}$.

Flüssigkeiten, die keine ausgesprochene Fluoreszenzfarbe zeigen, werden mit geeigneten Lösungsmitteln ausgeschüttelt. Es gelingt dann oft, namentlich wenn Stoffgemische vorliegen, die fluoreszierende Substanz in das Lösungsmittel überzuführen; so konnte ich (gemeinsam mit V. Reich) aus dem unter der Lampe erdfarbig erscheinenden Obstwein einen leuchtendviolett fluoreszierenden Stoff in Äther, Chloroform oder Amylalkohol bringen[44]).

P. W. Danckwortt[45]) schüttelt Tinkturen und Extrakte mit Äther, zum Nachweis des Chlorophylles, V. Kubelka und Vl. Nemec[46]) verwendeten Äther oder Äthylacetat zum Ausschütteln von Gerbstofflösungen, um die Fluoreszenz reintöniger zu erhalten.

Durch Wahl geeigneter Lösungsmittel kann man oft das Vorhandensein eines Stoffes an seiner Fluoreszenz noch erkennen, wo dies in fester Form nicht mehr möglich ist. Während man in letzterem Falle bei einem Gemische von Butter und Margarine diese erst bei einem Zusatz von 50% sicher erkennt, gelingt dies bei einer Lösung in Petroläther oder Äther schon bei einem Margarinegehalt von nur 10 bis 15% (M. Haitinger, H. Jörg und V. Reich[47]), bezw. H. P. Stadler[48]).

---

[43]) Bisher nicht veröffentlicht.

[44]) Allgem. Weinzeitung, **44**, Nr. 18 (1927).

[45]) Arch. Pharmaz. Ber. Dtsch. Pharmaz. Ges., **265**, 560 (1928).

[46]) Collegium, **1929**, 300.

[47]) Ztschr. angew. Chem., **41**, 815 (1928).

[48]) Ztschr. Unters. Lebensm., **55**, 405 (1928).

5. *Dämpfe.*

Die Dämpfe von Schwefel, Selen und Tellur fluoreszieren in überhitztem Zustande blau bis blaugrün, unterscheiden sich aber dadurch voneinander, daß die erregenden Strahlen in verschiedenen Wellengebieten liegen, und zwar für Schwefel in der Gegend von 2500 bis 3000 Å. E., für Selen zwischen 3000 und 4000 Å. E. und für Tellur in brechbarstem Teile des sichtbaren Violett (W. Steubing[49]), D. Diestelmeyer[50]) und H. Rakowic-Pogonzelska[51]).

E. L. Nichols und H. L. Howes[52]) haben gefunden, daß die grüne Thalliumlinie wesentlich intensiver zu sehen ist, wenn man die Flamme, in der sie ausgebildet wird, mit dem Lichte eines Thalliumamalgambogens bestrahlt. R. M. Badger[53]) hat diese Methode auch bei anderen Metallen angewendet und hat bei Magnesium, Quecksilber, Kupfer, Silber und Thallium deutliche, dagegen bei Aluminium, Strontium und Barium keine Fluoreszenz nachweisen können; Cadmiumdämpfe fluoreszieren nur sehr schwach, bei Natriumdämpfen ist die Fluoreszenz nur unter sehr günstigen Versuchsbedingungen erkennbar. Als erregendes Licht diente ein Kohlenbogen, der sich als besonders wirksam erwies, wenn die Kohle kleine Mengen des betreffenden Metalles als Verunreinigung enthielt.

IV. Versuche mit Adsorbentien.

Stoffe, die in gelöstem Zustande nicht oder nur sehr schwach fluoreszieren, leuchten oft sehr lebhaft auf, wenn sie mit geeigneten Adsorbentien in Verbindung gebracht werden, was sich dadurch erklärt, daß diese Stoffe nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in sehr feinverteiltem Zustande am Adsorbens haften. Diese Erscheinung, welche zuerst von L. Meunier und A. Bonnet[54]) an Tizera- und Quebrachoextrakten beobachtet wurde, haben L. Meunier und A. Jamet[55]) auch bei anderen Gerbstoffen gefunden.

---

[49]) Physikal. Ztschr., **14**, 1887 (1913).

[50]) Ztschr. wiss. Photogr., **15**, 18 (1916).

[51]) Bull. Intern. Polonaise, **1926**, A 243.

[52]) Phys. Rev., **23**, 473 (1924).

[53]) Ztschr. Physik, **55**, 56 (1929).

[54]) Compt. rend. Acad. Sciences, **180**, 2038 (1925), und Journ. Leather Trades Chemist, **9**, 346 (1925), und **10** 166 (1926).

[55]) Le cuir technique, **18**, 165 (1926).

O. Gerngross und Mitarbeiter[56]) haben diese Methode eingehend studiert und weiter ausgebildet. Als Adsorptionsmittel sind Cellulose in Form von reiner holzfreier Watte, Filterpapier, Kunstseide, in geringerem Maße auch Proteine, wie Wolle und entbastete Seide, geeignet; sie werden kurze Zeit in die Flüssigkeit eingelegt, abgepreßt und getrocknet; unter der Lampe zeigt sich dann bei geeigneten Bedingungen lebhafte Fluoreszenz. Bei meinen gemeinsam mit V. Reich durchgeführten Versuchen an Trauben und Obstweinen konnte ich (l. c.) dieselbe Erscheinung an Filtrierpapier beobachten und verwendete später ebenfalls Watte, die ich nach dem Abpressen auf Filtrierpapier auflege, das nach dem Trocknen verschieden fluoreszierende Zonen zeigt[57]). O. Mecheels[57a]) benützt ein ähnliches Verfahren zum Nachweis von Naphtholfärbungen.

Diese „Faserfluoreszenz", wie sie Gerngross im Gegensatz zur Flüssigkeitsfluoreszenz nennt, ist in vielen Fällen so widerstandsfähig, daß sie auch nach tüchtigem Spülen im Wasser nichts an ihrer Leuchtkraft verliert (Tizera), in anderen Fällen kann sie leicht abgewaschen werden (Dongaextrakt). Ihre Empfindlichkeit ist eine sehr große; sie ist beispielsweise bei Fichtenrindenextrakten noch bei Verdünnungen 1 : 10^6 und bei dem von O. Gerngross[58]) daraus isolierten Träger der Fluoreszenz der Fichtenrinde (vorläufig noch nicht benannt) 1 : 10^8.

Durch Verwendung verschiedener Adsorbentien konnten O. Gerngross, G. Sandor und K. Tsou[59]) für bestimmte Stoffe selektives Verhalten konstatieren. Kollagen und Nitrocellulose mit 10% N adsorbieren den gelb fluoreszierenden Stoff von Quebracho (Fisetin), nehmen aber den violetten Stoff der Fichtenrinde nicht an; mit steigendem Stickstoffgehalt verliert die Nitrocellulose ihr Adsorptionsvermögen. Dagegen wird die violett fluoreszierende Substanz wohl von kristallisierter Diacetylcellulose und Azetatseide (auch von Hydrocellulose, Viskoseseide und Stärke[60]) aufgenommen, nicht aber von Nitro- und auch nicht von Triacetylcellulose. Auch Cellophan ist für diesen Stoff ein geeignetes Adsorbens, nicht aber Cellon (G. SANDOR[61]).

---

[56]) a) O. Gerngross, N. Bán und G. Sandor, Collegium, **1925**, 565;
b) O. Gerngross und G. Sandor, Collegium, **1926**, 669 und **1927**, 681;
c) O. Gerngross und H. Hübner, Collegium, **1927**, 246 und 431, B. **60**, 2094 (1927).
d) O. Gerngross, Ztschr. angew. Chem., **41**, 50 (1928). Collegium, **1930**, 300.

[57]) M. Haitinger, L. Linsbauer und A. Eibl, Biochem. Ztschr., **215**, 192 (1929).

[57a]) Melliands Textilber, **12**, 501 (1931).

[58]) Collegium, **1929**, 512.

[59]) Collegium, **1929**, 512.

Durch Imprägnieren der Adsorptionsmittel mit verschiedenen Reagenzien, wie es O. DESMURES[62]) gleichfalls bei Gerbstoffuntersuchungen tut, können neue Anhaltspunkte gewonnen werden.

G. NOACK[63]) hat bei seinen Untersuchungen von kolloidalem nicht fluoreszierendem Chlorophyll a + b das Aluminiumhydroxyd C (Willstärker) als Adsorptionsmittel benützt; das adsorbierte Chlorophyll fluoresziert kräftig, während es an Kaolin, ebenso auch an Globin nur schwach, an anderen Eiweißstoffen gar nicht fluoresziert. H. KAUTSKY, A. HIRSCH und W. BAUMEISTER[64]), später H. KAUTSKY und A. HIRSCH[64a]) haben bei ihren Untersuchungen über Energieumwandlung an Grenzflächen zunächst Silikagel E. und Aluminiumhydroxyd der I. G. Farben A. G., später Zellulose und Eiweiß (Papier, Watte, Baumwolle, Kunstseide, Ramie, Cellophan, Eiklar, Gelatine, Seide usw.) als Adsorbentien für Farbstoffe verwendet; namentlich trockenes, glattes, stark geleimtes Papier lieferte besonders schön leuchtende Farbstoffadsorbate. Während die Adsorbate an Silikagel und Aluminiumhydroxyd sauerstoffempfindlich sind, sind es die organischen Adsorbate nicht, solange sie trocken sind.

V. Kapillaranalytische Untersuchungen.

Von verschiedenen Seiten wurde beinahe gleichzeitig versucht, Kapillaruntersuchungen für die Fluoreszenzanalyse auszunützen. P. W. DANCKWORTT und E. PFAU[65]) haben sie zur Untersuchung von Drogen und Alkaloiden, P. Petri[66] für den Nachweis von Pflanzenschädigungen durch Schwefeldioxyd und ich selbst[67] habe sie bei der Untersuchung von Trauben und Obstwein, dann von Fetten und Ölen und verschiedenen anderen Lebens- und Genußmitteln benützt.

---

[60]) O. GERNGROSS, Papierfabrikant, **25**, 49 (1927).

[61]) Ztschr. angew. Chem., **42**, 1108 (1929).

[62]) Journ. Intern. Leathers Trades Chemist, **13**, 615 (1929).

[63]) Biochem. Ztschr., **183**, 35 (1927).

[64]) B., **64**, 2053 (1931).

[64a]) B., **64**, 2677 (1931); **65**, 401 (1932).

[65]) Arch. Pharmaz. Ber. Dtsch. Pharmaz. Ges., **265**, 68 (1927), und **265**, 560 (1927).

Übereinstimmend hat sich gezeigt, daß sich beim kapillaren Aufstieg von Lösungen in Filtrierpapierstreifen eine oder mehrere Zonen ausbilden, die im gewöhnlichen Lichte unsichtbar sind, im Ultraviolett aber farbig aufleuchten. Die Methode ist sehr empfindlich: es lassen sich beispielsweise noch 0,001 mg Morphin in 30 cm^3 Flüssigkeit nachweisen und man erhält auch noch bei solchen Lösungen gefärbte Zonen, bei denen scharfe Alkaloidfällungsreagenzien versagen. (P. W. Danckwortt, l. c.) Sie hat daher auch ganz besonders in der Pharmakognosie zur Untersuchung von Extrakten und Drogen Anwendung gefunden. (R. Wasicky[68], A. Rosenfeld und S. Bolotnikow[69], H. Neugebauer[70], C. A. Rothenheimer[71], H. Kaiser und K. Eggensperger[72], G. Fodor und A. Kichler[73], J. Deininger u. a.[74]).

Zur Durchführung des Versuches werden Filtrierpapierstreifen von etwa 20 cm Länge und 1 bis 2 cm Breite derart frei aufgehängt, daß sie mit ihrem unteren Ende 1 cm tief in die Flüssigkeit eintauchen. Länge und Breite der Streifen spielt natürlich keine Rolle: dagegen sind die Eigenschaften des Filtrierpapieres von Wichtigkeit. H. Neugebauer (l. c.) hat unter 40 untersuchten Filtrierpapiersorten Schleicher und Schüll Nr. 604 als das geeignetste genannt: ich selbst ziehe 602 hart vor, das mir die schärfste Zonenabgrenzung gegeben hat.

Der Steigversuch selbst soll im Dunkel ausgeführt werden, weil viele fluoreszierende Substanzen gegen Sonnenlicht und auch gegen diffuses Tageslicht empfindlich sind; manche Autoren unterbrechen ihn nach einer oder wenigen Stunden (P. ERNST und E. JENTSCHITSCH bei Drogen[75]). Besser ist es, ihn so lange fortzusetzen, bis die Flüssigkeit die maximale Steigehöhe erreicht hat, weil die Erscheinungen dann viel deutlicher werden, was auch J. DEININGER (l. c.) beobachtet hat; ich unterbreche daher den Versuch in der Regel nach 15 bis 20 Stunden und beobachte erst nach vollkommener Trocknung im Dunkeln. Man sieht meistens drei oder mehrere Zonen, und zwar die Eintauchzone, dann eine lange oft wieder selbst in verschiedenen charakteristischen Farben leuchtende Zone und die Randzone. Bei Stoffgemischen wird man der oberen Grenze der Eintauchzone und der Randzone besondere Aufmerksamkeit zuwenden müssen, weil gerade dort die Kolloide festgehalten werden.

---

[66] Boll. R. Staz. Industria Pelli, **5**, 201 (1927).

[67] Allgemeine Weinzeitung, **44**, 18 (1927), u. a. v. a. O.

[68] Pharmaz. Monatschr., **10**, 17 (1929).

[69] Pharmac. Journ. (russ.), **1928**, 31.

[70] Pharmaz. Ztschr., **74**, 626 (1929), und Apoth.-Ztg., **45**, 80 (1930).

[71] Pharmaz. Ztg., **74**, 712 (1929).

[72] Ztrbl. Pharm., **1929**, Nr. 42.

[73] Pharmaz. Monatsschr., **11**, 29 (1930).

[74] Pharmaz. Ztg., **75**, 247 (1930).

RAPP[76]) und C. A. ROJAHN[77]) verwenden Streifen von mehr als 50 cm Länge und kapillarisieren in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre unter einem entsprechend hohen Rezipienten; dadurch entstehen langgestreckte Kapillarbilder mit weit auseinandergezogenen Zonen. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß man leicht eine Anordnung treffen kann, um bei bestimmter Temperatur zu kapillarisieren, sowie daß die Möglichkeit gegeben ist, oxydative Vorgänge während des Steigversuches auszuschalten, indem man den Rezipienten mit Wasserstoff oder Stickstoff füllt; auch bei rasch verdunstenden Lösungsmitteln empfiehlt sich die Methode nach RAPP. Ein Nachteil aber ist die Unhandlichkeit der langen Streifen für die Beobachtung unter der Lampe sowie der Umstand, daß die Bilder verwaschen und die Zonen unscharf abgegrenzt sind; man wird für gewöhnlich mit der alten Methode auskommen.

Zur raschen Orientierung genügt es oft, einen Tropfen Flüssigkeit auf Filtrierpapier zu bringen, auf dem sich die Zonen ringförmig ausbilden.

Die Beschreibung der Farben der einzelnen Zonen unterliegt gewissen Schwierigkeiten und ist vom subjektiven Empfinden des Beobachters abhängig. M. GUYOT[78]) vergleicht die Intensität der

---

[75]) Pharmaz. Monatsh., **10**, 67 (1929).

[76]) Pharmaz Ztg., **73**, 1585 (1928).

[77]) Ebenda, **74**, 14 (1929).

[78]) Ann. des Falsifications, **1931**, Nr. 269.

Streifen zentimeterweise mit dem Komparator von Bernheim-Ripert und trägt die ermittelten Werte auf Millimeterpapier auf.

Streifen, welche als Teststreifen dienen sollen, müssen vor Licht geschützt aufbewahrt werden; auch dann ist es noch möglich, daß sie sich mit der Zeit verändern, was bei Vergleichen berücksichtigt werden muß.

VI. Einfluß chemischer Reagenzien.

Chemische Einflüsse bewirken sehr oft eine Änderung der Fluoreszenz oder ein allmähliches oder plötzliches Auslöschen derselben; es sind daher die Proben selbst sowie die Kapillarstreifen mit geeigneten Reagenzien zu behandeln.

Namentlich der Wechsel der Reaktion von sauer auf alkalisch oder umgekehrt bewirkt oft einen sehr drastischen Fluoreszenzwechsel.

Schon R. Boyle[79]) benützte diese Eigenschaft eines Aufgusses von lignum nephriticum dazu, um zu erkennen, ob ein Stoff sauer oder alkalisch sei. Es ändert sich nicht nur die Fluoreszenzfarbe mit der Wasserstoffionenkonzentration, sondern der Umschlag ist oft ein so scharfer, daß manche Stoffe als Indikatoren zum Titrieren im ultravioletten Lichte verwendet werden können. Dies bedeutet, daß farbige und trübe Flüssigkeiten im Ultraviolett ebenso leicht und mit derselben Genauigkeit titriert werden können wie farblose in gewöhnlichem Licht.

Als erste haben R. Mellit und A. Bischoff[80]) das Chininsulfat als fluoreszierenden Indikator verwendet, mit dem sich starke Basen und Säuren, ebenso schwache Säuren, nicht aber schwache Basen titrieren lassen.

J. Eisenbrand[81]) hat gefunden, daß das Chinin entsprechend seiner Eigenschaft als zweisäurige Base zwei Umschlagpunkte bei $p_H = 6$ und bei $p_H = 9{,}5$ bis 10 besitzt; der erste von vergißmeinnichtblau in violett liegt in der Nähe von Methylorange und Methylrot, der zweite von violett in farblos ungefähr in der Nähe des Umschlages von Phenolphthalein; deshalb lassen sich starke und schwache Basen gleich gut titrieren und das Chinin wird dadurch gewissermaßen zum Universalindikator im ultravioletten Lichte. Bei der Titration starker Säuren erfolgt der Umschlag von vergißmeinnichtblau in violett (pH = 6) sehr rasch, bei schwachen Säuren nimmt man zunächst Zwischentönungen zwischen blau und violett wahr, worauf ein ziemlich scharfer Umschlag nach farblos (pH = 9,5) erfolgt.

---

[79]) Experim. et considerat. de coloribus, **1663** ars Exp. X., und besonders Collarium Exper. X. (zitiert nach F. Goppelsröder, Ztschr. analyt. Chem., **7**, 195 [1868]).

[80]) Compt. rend. Acad. Sciences, **182**, 1616 (1926).

[81]) Pharm. Ztg., **74**, 249 (1929).

Bei starken Basen wird bis zu vergißmeinnichtblau, bei schwachen Basen auf den Umschlag vergißmeinnichtblau violett titriert.

Bei Chinidin liegen die Verhältnisse ähnlich wie bei Chinin; auch Optochinin ist brauchbar, dagegen nicht Hydrastinin. Cotarnin gibt bei pH = 12,5 einen Umschlag von gelb zu weißlich, Salicylsäure hat einen Umschlag von farblos in dunkelblau bei pH = 3, α-Naphthol schlägt von farblos in hellblau, β-Naphthol bei pH = 8,5 von farblos in saftigblau um. (Eisenbrand l. c.)

Von G. A. Bravo[82]) wurde Eosin, das bei pH = 0,0 — 3,0 grün fluoresziert und Dichlorfluoreszein mit grüner Fluoreszenz bei pH = 4,5 — 6,0 verwendet; gleichfalls grün fluoreszieren bei pH = 4,5 Fluoreszein und Erythrosin (Y. Volmar[83]).

Letztgenannte Indikatoren haben ein weites Umschlagintervall, innerhalb dessen sich nur die Intensität, aber nicht die Fluoreszenzfarbe ändert. Dagegen zeigen nachfolgende Verbindungen wieder einen scharfen Farbenumschlag, und zwar Acridin bei pH = 6 von grün zu violett (Y. Volmar und E. Widder[84]). Umbelliferon (R. Robl[85]) bei pH = 6,5 — 7,6 von farblos in intensivblau, ebenso das β-Methylumbelliferon bei 5,8 — 7,5 (C. Bülow und W. Dick[86]).

Namentlich das von R. Robl (l. c.) vorgeschlagene Umbelliferon hat sich nach zahlreichen Versuchen von Y. Volmar und E. Widder[87]) außerordentlich gut bewährt; ein Tropfen einer 0,001%igen Lösung gibt einen deutlichen Umschlag (von Acridin braucht man 10mal, von Chinin 100mal und von Fluoreszein 500mal mehr). Sie konnten damit bei gewöhnlicher Temperatur starke Säuren und Basen, aber auch Ammoniak, Kohlensäure, Oxal-, Citronen- und Salicylsäure, in der Hitze oder beim Durchleiten von Luft oder Dampf auch Alkalikarbonate und Azetate titrieren.

---

[82]) Ind. chimica, **4**, 8 (1929).

[83]) Arch. de Phys. Biol., **6**, 61 (1927).

[84]) Chimie et industrie, **21**, 160 (1929).

[85]) B., **59**, 1725 (1926).

[86]) Ztschr. analyt. Chem., **75**, 81 (1928).

[87]) Bull. d. l. Soc. chim. de France, **43**, 813 (1928), und **45**, 130 (1929). — Comp rend. du VIIIem Congres de Chimie Industr.-Chim. et Ind. (1928).

Andere organische Substanzen, welche von A. G. Nasini und P. de Cori[88]) untersucht wurden, sind in der weiter unten folgenden Tabelle verzeichnet. Diese beiden Autoren berichten auch über die Titration verschiedener industrieller Produkte. Die Methode gibt für die Untersuchung von Celluloseablaugen, sulfurierten Ölen, Essig und Indigokarmin gute, für Biere und Zuckersäfte nicht brauchbare Resultate. Bei gefärbten Weinen erhielten sie im Vergleich zu Lackmus zu hohe Werte, während L. Colombier (l. c.) verglichen mit Phenolphthalein zu niedrige Werte konstatierte. Y. Volmar und J. M. Clavera[89]) haben mit Umbelliferon im Vergleiche mit potentiometrischen Messungen auch bei Weinen sehr genaue Neutralisationspunkte erhalten; dagegen hat die Methode bei Bieren wegen ihrer starken Eigenfluoreszenz versagt.

Y. Volmar[90]) findet die Methode auch für die Verwendung in der Mikrochemie geeignet.

Nach Umschlagpunkten geordnet sind bisher folgende fluoreszierende Indikatoren untersucht worden:

Eosin	0,0 — 3,0	grün
Salicylsäure	3,0	ungefärbt bis dunkelblau
Erythrosin	4,0 — 4.5	grün
Fluoreszein	4,0 — 4,5	grün
Phloxin[88])	3,35— 5,0	ungefärbt bis hellgelb
Dichlorfluoreszein	4,0 — 6,0	grün
Acridin	5,0	grün bis violett
Chinin (erster Umschlag)	6,0	vergißmeinnichtblau bis violett

---

[88]) Atti del III Congresso Nazionale di Chim. pura ed applicata, Firenze e Toscana, **1929**, 698.

[89]) Journ. Chim. e Pharm., **13**, 561 (1931). — Anales Soc. Espanola Fisica Quim., **29**, 247 (1931).

[90]) Bull. d. l. Soc. chim. de France, **41**, 774 (1927).

Umbelliferon	6,5 — 7,6	ungefärbt bis blau
β-Methylumbelliferon	7,0	ungefärbt bis blau
α-Naphtholsulfonsäure[88])	8,2	dunkelblau bis hellblauviolett
β-Naphthol	8,6	ungefärbt bis blau
1-Naphthol-2-Sulfonsaures Natrium	9,4	dunkelblau bis hellviolett
β-Naphtholsulfonsäure[88])	9,5	dunkelblau bis hellviolett
Chinin (zweiter Umschlag)	9,5 —10	violett bis farblos
Cumarin[88])	9,8 —12	schwachgrün bis hellgrün
Kotarnin[88])	12,5	gelb bis weißlich
α-Naphthionsäure[88])	12 —13	azurblau bis grün
β-Naphthionsäure[88])	12 —13	azurblau bis violett

Zur Ausführung der Titration empfiehlt P. W. Danckwortt (Lumineszenzanalyse), im durchfallenden Lichte zu arbeiten, während R. Robl (l. c.), G. Grant[90a]) und A. E. Nasini und P. de Cori (l. c.) im auffallenden Lichte titrieren; letztere verwenden hierzu eine entsprechend gebogene Bürette.

Andere chemische Einwirkungen, wie der Einfluß von Oxydations- und Reduktionsmitteln, können die Fluoreszenz oft wesentlich verändern, erst auftreten lassen oder gänzlich zum Verschwinden bringen; so zeigt beispielsweise Hydrastininsulfat, frisch hergestellt, keine Fluoreszenz; sie erscheint aber sofort bei Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd (E. Bayle und R. Fabre[91]).

Oft ist auch der Eintritt eines Metalls oder eines Radikals von Einfluß für die Fluoreszenz. So fluoresziert beispielsweise oxychinolinsulfonsaures Kali (Chinosol) nicht, während die entsprechende Zinkverbindung äußerst lebhaft gelb fluoresziert (P. W. Danckwortt, Lumineszenzanalyse).

Welche Reagenzien noch zur Verwendung kommen sollen, ist von der Natur der vorliegenden Probe abhängig. F. M. Litterscheid[92]) verwendet beispielsweise bei Untersuchung von Melassen und Stärkesirup usw. Bleiessig und beobachtet die Fluoreszenz des Niederschlages und der überstehenden Flüssigkeit. H. Neugebauer

---

[90a]) Analyst, **56**, 663 (1931).

[91]) Compt. rend. Acad. Sciences, **178**, 2181 (1924).

[92]) Ztschr. Unters. Lebensmittel, **55**, 175 (1929).

(l. c.) untersucht die einzelnen Zonen der Kapillarstreifen durch Betupfen derselben mit Säuren, Basen, Aluminiumsulfat, Magnesiumsulfat, Borsäure usw. L. ZECHNER, später L. ZECHNER und G. GSTIRNER[92a]) untersuchten Tinkturen und Extrakte sowohl unverändert als auch in saurer und ammoniakalischer Lösung, in Ausschüttelungen mit verschiedenen Lösungsmitteln, endlich das Filtrat der Fällung mit basischem Bleiacetat unter gleichen Bedingungen.

K. WEBER[92b]) hat die auslöschende Wirkung anorganischer und organischer Substanzen auf die Fluoreszenz von Natriumnaphtionat und Chininsulfat untersucht. Die größte Wirkung hat das NO'_3-ion; hierauf folgen: $J' > Br' > Cl' > SO''_4$. Die Ionen der Alkalien und Erdalkalien sind unwirksam; dagegen wirken Ag' und Cu'; Hydrochinon, Pyrogallol und Phenol setzen die Fluoreszenz des Natriumnaphtionats herab.

VII. Einfluß von Temperatur und Feuchtigkeit auf die Fluoreszenz.

Mit einer Temperaturänderung geht nicht selten eine Änderung der Fluoreszenz parallel. So wird Zinkoxyd nach A. EIBNER[93]) irreversibel heller gelb.

J. EWLES[94]) hat gefunden, daß die hellblaue Fluoreszenz, welche viele weiße Salze zeigt, beim Trocknen vollständig verschwindet. Auch G. KLEIN und H. LINSER[95]) berichten, daß es eine große Anzahl von Stoffen gibt, die im trockenen Zustande nicht leuchten, aber sofort fluoreszieren, wenn man sie mit einem Lösungsmittel befeuchtet. A. PETRIKALIN[96]) hat den Einfluß der Feuchtigkeit auf die Fluoreszenz gezeigt, indem er auf einer langsam rotierenden Scheibe pulverisiertes Chininsulfat ringförmig anordnete, das beim Passieren einer darüber angeordneten Heizspirale an einer Stelle entwässert und an einer anderen Stelle durch An-blasen mit feuchter Luft hydratisiert wurde; dieser zweite Prozeß war von lebhafter Fluoreszenz begleitet.

[92a]) Pharm. Monatsh., **11**, 6 (1930); ebenda **11**, 28, 74, 221 (1931), **12**, 193 (1931).

[92b]) Ztschr. physikal. Chem., Abt. B, **15**, 18 (1931).

[93]) Chem.-Ztg., **55**, 593 (1931).

[94]) Nature, **125**, 706 (1930).

[95]) Österr. Bot. Ztschr., **79**, 125 (1930).

[96]) Ztschr. Physik, **42**, 435 (1927).

Lösungen verhalten sich gegenüber Temperaturerhöhungen verschieden; während die blaue Fluoreszenz von Glyzerin, Schwefelsäure und Zuckersirup ausgelöscht wird (S. J. WAWILOW und L. A. TUMMERMANN[97]), fluoresziert eine Äsculinlösung von 100° etwas stärker als eine solche von 20° (G. KLEIN und H. LINSER[98]). W. O. KERMACK und R. H. STADLER[99]) beobachteten bei 5,6-Benz-4-carbolinmethylsulfat, F. CRONER[100]) bei Ölen eine Farbvertiefung, J. K. JENESS[101]) hat alkoholische Lösungen von Rhodamin B und Fluoreszein zwischen — 60° und + 60° spektrophotometrisch untersucht und eine Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzbanden konstatiert, die aber nicht für alle Substanzen gleichsinnig zu sein scheinen. H. HELLSTRÖM[101a]) beobachtete beim Porphyrin bei Temperaturerhöhung eine Bandenverschiebung gegen Rot.

H. KAUTSKY, A. HIRSCH und W. BAUMEISTER[102]) haben bei Farbstoffadsorbaten einen sehr bemerkenswerten Einfluß der Temperatur festgestellt. Erwärmen vermindert die Phosphoreszenzdauer, Abkühlen auf die Temperatur der flüssigen Luft erhöht sie auf das Doppelte bis Dreifache und verschiebt die Emissionsfarbe in das langwellige Gebiet (z. B. bei einem Euchrysin-Adsorbat von grün-gelb nach tiefrot).

VIII. Einfluß des Lichtes auf die Fluoreszenz.

Sowohl das Sonnenlicht als auch künstliches Licht bewirkt eine Änderung der Fluoreszenz, und zwar zumeist einen Rückgang derselben. R. E. LIESEGANG[103]) hat einen solchen bei Zellstoff, Kollodiumwolle und Gelatine im Sonnenlichte wahrgenommen, und gibt der Vermutung Ausdruck, daß auch während der Ultraviolettanalyse eine solche Veränderung eintreten könne. Tatsächlich berichten eine Reihe von Autoren über Beobachtungen in diesem Sinne, so J. C. Lennan[104]) und F. M. Cale[105]) bei Lösungen von Äsculin, R. W. Wood[106]) bei Eosin, Rhodamin, Naphthalinrot, Phloxin und Resorufin, Ch. Monreu, Ch. Dufraisne und P. M. Dean[107]) bei einer Lösung von Rubren in Benzol, O. Gerngross und M. Schultz[108]) über das Verblassen der gelben Fluoreszenz der Milch im Lichte der Quecksilberdampflampe, L. Meunier und G. Rey[109]) über das Verschwinden der blauen Fluoreszenz der Wolle, D. L. Gamble und G. F. Stutz[110]) über ein Vergilben der Harze im Ultraviolettlicht, M. R. Marcile[111]), ebenso R. Stratta und A. Mangini[112]) über die Veränderung der Fluoreszenz bei Bestrahlung vegetabilischer Öle, F. Wischo[112a]) über die Zerstörung der gelben Fluoreszenz der Testesextrakte.

---

[97]) Ztschr. Physik, **54**, 270 (1929).

[98]) Biochem. Ztschr., **219**, 51 (1930).

[99]) Journ. chem. Soc. London, **1928**, 32.

[100]) Ztschr. angew. Chem., **39**, 35 (1926).

[101]) Phys. Rev., **34**, 1275 (1929).

[101a]) Ztschr. physiol. Chem., Abt. B, **12**, 353 (1931).

[102]) B., **64**, 2031 (1931).

[103]) Ztschr. wiss. Mikroskopie, **43**, 517 (1927).

K. G. Mathur und S. S. Bhatagnar[113]) haben Lösungen von Eosin, Uranin, Acriflavin und Chinin sowohl in offenen Gefäßen, also bei Gegenwart von Luft, als auch in zugeschmolzenen Röhren bei Ausschluß von Luft belichtet und die Intensität an der Schwärzung eines Films, auf den das Fluoreszenzlicht einwirkte, sowie die Absorptionsspektra und Brechungsexponenten gemessen; es ergaben sich beträchtliche Veränderungen bei den in Gegenwart von Luft belichteten Proben, dagegen keine Veränderung dort, wo Luft ausgeschlossen war.

Daraus wird von den Verfassern geschlossen, daß die Photozersetzung fluoreszierender Farbstoffe ein Oxydationsphänomen ist. Auch S. Rafalowski[113a]) erklärt das Verblassen der roten Fluoreszenz des Porphyrins durch die Einwirkung des Sauerstoffes.

---

[104]) Proc. Royal, Soc. London (Ser. A), **102**, 256 (1923).

[105]) Proc. Trans. Roy. Soc. Canada (3), 16, III, 257 (1923).

[106]) Philos. Magazine (6), **43**, 757 (1922).

[107]) Compt. rend. Acad. Sciences, **182**, 1440 (1926).

[108]) Chem.-Ztg., **51**, 501 (1927).

[109]) Compt. rend. Acad. Sciences, **183**, 596 (1927).

[110]) Ind. engin. chem., **21**, 330 (1929).

[111]) Ann. Falsifications, **21**, 189 (1928).

[112]) Giorn. chim. ind. appl., **10**, 203 (1928).

[112a]) Pharm. Monatsh., **11**, 224 (1931).

[113]) Ind. Journ. Physics, **3**, 37 (1928).

[113a]) Ztschr. Physik, **71**, 798 (1931).

Dagegen behauptet J. Becker[114]), daß die von ihm beobachtete Fluoreszenzänderung pflanzlicher Öle eine reine Lichtwirkung und nicht durch Ozon bedingt ist.

Während in fast allen Fällen durch die Einwirkung des Lichtes eine Abnahme der Fluoreszenz konstatiert wurde, hat G. Wels[115]) die Beobachtung gemacht, daß die bläuliche Fluoreszenz des Serumglobulins durch Bestrahlung mit dem Gesamtlichte der Quecksilberlampe viel intensiver wird; über eine ähnliche Beobachtung berichtet auch C. Doelter[116]), demzufolge ein blaustichig fluoreszierender Fluorit nach längerer Bestrahlung rosenrot aufleuchtete.

Nach eigenen Versuchen (M. Haitinger und V. Reich[117]) ist die Wirkung des unfiltrierten Lichtes eine weitaus intensivere als die des gefilterten ultravioletten Lichtes; Filtrierpapier, das mit Lösungen fluoreszierender Stoffe, wie Anthrazen, Salicylsäure, Fluoreszein usw., getränkt war, ist unter der Einwirkung der Gesamtstrahlung einer ultraviolettreichen Lichtquelle schon nach wenigen Minuten deutlich verblaßt, während beim gefilterten Lichte auch nach einstündiger Bestrahlung visuell eine Abnahme der Intensität nicht wahrnehmbar war; die bleichende Wirkung scheint der Hauptsache nach durch Licht kürzerer Wellenlänge verursacht zu werden als jenes Licht, das durch das Schwarzglasfilter hindurchgeht; dieselben Beobachtungen hat auch P. G. Nagle[118]) an Kautschukfüllstoffen gemacht.

Daneben scheint aber auch der Verteilungsgrad der Substanz bei diesen Erscheinungen eine Rolle zu spielen.

Bei der feinen Verteilung, in der sich der vom Filtrierpapier adsorbierte Stoff befindet, ist die Wirkung eine sehr rasche; dagegen ist bei einer Schichtdicke von 1 bis 2 mm selbst nach einer Bestrahlungsdauer von einer Stunde visuell kaum eine Veränderung wahrnehmbar. Bei Lösungen scheint die Konzentration von Einfluß zu sein; je verdünnter die Lösung ist, desto mehr wird sie vom Lichte beeinflußt. So konnte ich bei quantitativen Untersuchungen bei einer 0·002%igen Äsculinlösung nach einer Bestrahlung von 10 Minuten — diesmal aber mit filtriertem, ultraviolettem Lichte — keine Abnahme der Fluoreszenzintensität konstatieren, während die Intensität einer 0·0006%igen derartigen Lösung in der gleichen Zeit um 5·5% abnahm[119]). Dieses Beispiel zeigt, daß auch das filtrierte Licht Fluoreszenzänderungen bewirken kann, die zwar für das Auge nicht wahrnehmbar, aber quantitativ feststellbar sind. Daher müssen sowohl die Proben selbst als auch die Reagenzien vor Licht geschützt werden; man entnehme sie nur partienweise in den für die Untersuchung nötigen Mengen den Vorratsgefäßen.

---

[114]) Ztschr. angew. Chem., **73**, 99 (1926), und Med. Wochenschr., **1926**, 99.

[115]) Pflügers Arch. Physiol., **219**, 738 (1928).

[116]) Ztrbl. Min. u. Geol., **1921**, 479.

[117]) Ztschr. angew. Chem., **41**, 982 (1928).

[118]) Trans. Rubber Ind., **3**, 304 (1927).

IX. Photographische Reproduktion von Fluoreszenzerscheinungen.

In manchen Fällen mag es wünschenswert sein, Fluoreszenzerscheinungen photographisch festzuhalten. Dies gelingt leicht mit jeder Kamera, wenn man nur dafür sorgt, daß das vom Objekt nicht absorbierte Ultraviolett nicht zur Platte gelangt, da diese sonst gleichmäßig geschwärzt würde. Man stellt daher vor das Objektiv des photographischen Apparates ein Filter auf, das das Ultraviolett absorbiert, aber das sichtbare Fluoreszenzlicht durchläßt. Als solches hat A. Miethe[120]) später K. Lambrecht[121]) bei der Photographie von Fossilien eine 1%ige Lösung von Ceriammoniumnitrat in Wasser in 10 mm dicker Schicht verwendet. P. W. Danckwortt (Lumineszenzanalyse) hat von Fossilien, Briefmarken, Banknoten, Ölgemälden und anderen Objekten Fluoreszenzaufnahmen gemacht und sie mit solchen im gewöhnlichen Licht verglichen und die Brauchbarkeit der Fluoreszenzphotographie in der gerichtlichen Chemie und für die Erkennung von Fälschungen demonstriert.

Als Lichtfilter wurden außer Ceriammoniumnitrat noch eine Lösung von 0.5 g Triphenylmethan in 70 ccm Alkohol von G. Kögel[122]), Didymnitrat von W. Scheffer[123]), das Gelbfilter

---

[119]) Bisher nicht veröffentlicht.

[120]) Photogr. Korresp., **63**, 69 (1927).

[121]) Verhandl. d. Zool. Ges. Wien, **78**, 637 (1928).

[122]) Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Teil 2, Heft 17.

[123]) Photogr. Industrie, **26**, 128 (1928).

GG_4 der Firma Schott und Gen. von E. Wagner[124]), ferner noch Lösungen von Äsculin und Chininsulfat in Alkohol empfohlen. Alle diese Filter haben den Nachteil, daß sie entweder selbst gefärbt sind oder mehr oder weniger stark fluoreszieren; Triphenylmethan, Didymnitrat, Äsculin und Chininsulfat absorbieren außerdem das Ultraviolett nicht vollkommen. E. Furegg[125]) erhielt bei seinen Autochromaufnahmen nur mit Ceriammoniumnitrat einwandfreie Bilder, während Triphenylmethan blaustichige und unscharfe Bilder lieferte, bei denen die Rotfluoreszenz vollständig verschwunden war. Chininsulfat gab trübe Bilder.

Ein farbloses Filter, das auch nicht fluoresziert, hat K. Weber[126]) im Natriumnitrit gefunden.

Eine 2%ige wässerige Lösung absorbiert bei einer Schichtdicke von 7 mm faktisch alles Ultraviolett und läßt fast alles sichtbare Licht durch.

Für die Ausführung der photographischen Aufnahme müssen die Objekte derart aufgestellt werden, daß einerseits die Fluoreszenz eine möglichst intensive ist, anderseits das Objekt vollkommen ausgeleuchtet ist. Größere Objekte müssen daher ziemlich weit entfernt von der Lichtquelle aufgestellt werden.

P. W. Danckwortt (Lumineszenzanalyse) verwendet als solche die Hanauer Analysenlampe, in deren Rückwand er ein größeres Fenster als das übliche einsetzt, und stellt die Objekte in einer Entfernung von 75 bis 100 cm vor diesem auf. Die Expositionszeiten schwanken zwischen 30 Sekunden (bei sehr stark fluoreszierenden Objekten) bis zu 2½ Stunden (bei Fossilien nach Lambrecht l. c.).

Über Autochromaufnahmen berichtet E. Furegg (l. c.) und P. Ernst[127]). Ersterer hat anknüpfend an seine gemeinsam mit R. v. Querner[128]) gemachten Beobachtungen über die Fluoreszenz von Gastropodenschalen diese als Objekte benützt und ihre Fluoreszenz durch auffallendes Licht erregt; für Rotfluoreszenz war eine Belichtungszeit von 5 Stunden, für Gelbfluoreszenz eine solche von 2¾ Stunden erforderlich. Letzterer benützte einem Vorschlage P. W. Danckwortt's (Lumineszenzanalyse) folgend zwei Analysenlampen, wodurch das Objekt von zwei Seiten beleuchtet werden kann. Die Expositionszeiten schwanken zwischen 3 bis 10 Stunden bei normalen Platten, während bei hypersensibilisierten Platten 18 bis 60 Minuten genügten.

---

[124]) Paläontolog. Ztschr., **10**, 298 (1928).

[125]) Photogr. Korresp., **66**, 234 (1930).

[126]) Photogr. Korresp., **66**, 357 (1930).

[127]) Photogr. Korresp., **67**, 149 (1931).

[128]) Ztschr. wiss. Zool., **136**, 355 (1930).

R. Lassé[129]) verwendet bei der Untersuchung von Textilien und Hölzern das Kontaktverfahren. Hierzu wird zwischen Platte und Gewebe ein Gelbfilter (GG_9 oder GG_{10} von Schott und Genossen) eingelegt und dann mit ultraviolettem Lichte belichtet.

X. Fluoreszenzmikroskopie.

Wenn auch ein großer Teil auf makroskopischem Wege gewonnenen Resultate in das Gebiet der Mikrochemie fällt, so wird man doch noch weiter kommen, wenn man Fluoreszenzerscheinungen mit dem Mikroskope beobachtet. Schon im Jahre 1905 hat sich A. Köhler[130]) mit mikroskopischen Untersuchungen im ultravioletten Licht beschäftigt und 1911 hat die Firma „Optische Werke C. Reichert“ in Wien nach den Angaben von O. Heimstädt[131]) und dann die Firma Zeiß in Jena ein Fluoreszenzmikroskop nach Angaben von H. Lehmann[132]) in den Handel gebracht. In beiden Fällen diente als Lichtquelle der Kohlenbogen und ich möchte nicht unterlassen zu erwähnen, daß mit diesen beiden, allerdings noch recht lichtschwachen Instrumenten von H. Lehmann[133]) selbst, dann aber auch von R. Wasicky[134]), O. Wolf[135]), W. Lenz[136]), F. E. Lloyd[137]), H. Stübel[138]) und anderen die ersten Grundlagen der Fluoreszenzanalyse und -mikroskopie gewonnen wurden. Die vielseitige Verwendungsmöglichkeit, welche die Quecksilberdampflampe für makroskopische Beobachtungen hat, hat zu einer Reihe von Improvisationen geführt, die diese Lampe auch für mikroskopische Beobachtungen zu verwenden gestattet, wie sie von P. W. DANCKWORTT (Lumineszenzanalyse), M. HAITINGER[139]) und P. METZNER[140]) vorgeschlagen wurden. Anderseits wurden einfache Vorrichtungen unter Verwendung eines Kohlenbogens als Lichtquelle von P. METZNER[141]) und O. VODRAZKA[142]) beschrieben. G. KÖGL[143]) verwendet für visuelle Beobachtung eine Osram-Punktlichtlampe, für photographische Aufnahmen und stärkere Vergrößerungen eine Spiegelbogenlampe von Busch[144]).

---

[129]) Melliands Textilberichte, **11**, 600 und 687 (1930), und Mikrokosmos, **24**, 187 (1931).

[130]) Ztschr. wiss. Mikroskopie, **21**, 129 (1905).

[131]) Ebenda, **28**, 330 (1911).

[132]) Physikal. Ztschr., **13**, 35 (1912). und Ztschr. wiss. Mikroskopie, **30**, 418 (1913.)

[133]) Physikal. Ztschr., **11**, 1039 (1910) u. l. c.

[134]) Pharmaz. Post, **46**, 877 (193), Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel, **30**, 25 (1915), und Thoms Handbuch der praktischen und wissenschaftlichen Pharmazie, Berlin-Wien (1924).

[135]) Chem.-Ztg., **36**, 197 und 1039 (1912).

[136]) Ztschr. analyt. Chem., **54**, 27 (1927).

[137]) Science, **59**, März (1924).

[138]) Pflüger's Arch. d. Physiol., **142**, 1 (1911).

Ich selbst habe, um Flächenhelligkeit und Ultraviolettreichtum noch weiter zu steigern, einen zwischen metallischem Eisen übergehenden Flammenbogen als Lichtquelle verwendet (HAITINGER-REICHERT'sches Fluoreszenzmikroskop[145]).

Die Untersuchung von chemischen Präparaten auf ihre Fluoreszenz erfolgt zumeist an festen Proben; weil das Präparat dort am stärksten zur Fluoreszenz angeregt wird, wo es von ultraviolettem Lichte getroffen wird, was bei der gewöhnlichen Beobachtungsart die vom Auge abgewendete Fläche wäre, wird im auffallenden Lichte unter Verwendung eines Auflichtspiegelkondensors beobachtet. Man erhält stark leuchtende Bilder auf tiefschwarzem Grunde. Hierzu soll der Mikroskoptisch eine größere (zirka 35 mm Durchmesser) Tischöffnung haben, in die ein schmaler Reifen eingesetzt wird, der durch drei möglichst dünne Speichen mit einer Zentralblende verbunden ist; darauf kommt der Objektivträger derart gelegt, daß das Präparat über der Zentralblende liegt.

Die große Helligkeit dieser Anordnung gestattet die Verwendung des Spektralokulars; viele Stoffe, wie beispielsweise Uranylverbindungen, Anthrazen, Chlorophyll, Porphyrin u. a., zeigen im Fluoreszenzlicht charakteristische Bandenspektra, andere wieder ein kontinuierliches Spektrum mit deutlich erkennbarem Helligkeitsmaximum.

---

[139]) Mikrochemie, **VIII**, 81 (1930).

[140]) Biologia Generalis, 6, 415 (1930).

[141]) l. c. und Ztschr. wiss. Mikroskopie, **45**, 51 (1928).

[142]) Mikrokosmos, 24, 47 (1930).

[143]) Chem. Fabrik, 2, 55 (1928), Mikrochemie, **VII**, 305 (1929), Photogr. Korresp., **64**, 12 (1928).

[144]) H. NAUMANN. Blätter f. Untersuchungs- und Forschungsinstrumente der Emil Busch A. G., **3**, 21 (1929).

[145]) Mikrochemie, **IX**, 430 (1931).

Ganz besonders wertvolle Dienste leistet die Fluoreszenzanalyse bei der Untersuchung von chemischen Präparaten auf ihre Reinheit. Fr. Hein und W. Retter[146]) haben schon makroskopisch den Einfluß nicht fluoreszierender Substanzen, welche fluoreszierenden zugemischt werden, untersucht und jenen Anteil von „Decksubstanzen" ermittelt, der hinreicht, die Fluoreszenz auszulöschen. Diese sind bei makroskopischer Beobachtung verhältnismäßig groß, unter dem Mikroskope aber sind noch kleine Mengen fluoreszierender Substanzen zu erkennen.

P. W. Danckwortt[147]) hat mit seiner Anordnung für Fluoreszenzmikroskopie bei einer Mischung von Zinkoxyd und Zinnober im Verhältnisse 1 : 100 noch einzelne leuchtende Punkte, bei homöopathischen Verreibungen von Uranylnitrat in Milchzucker ersteres noch bei einem Verhältnis 1 : 10^6 erkennen können. Ich habe mit meinem lichtstarken Fluoreszenzmikroskope das Zinkoxyd in Zinnober noch bei einem Mischungsverhältnis 1 : 10.000 deutlich aufleuchten gesehen[148]).

Fluoreszenzerscheinungen, die bei makroskopischer Beobachtung nicht mehr wahrgenommen werden, können unter Umständen im Mikroskope noch gesehen werden. So habe ich die weiter oben beschriebene Fluoreszenz von Fluoreszein, Umbelliferon und Eosin in feinverteiltem Zustande erst bei mikroskopischer Betrachtung erkennen können.

XI. Quantitative Untersuchungen.

Die quantitativen Untersuchungen werden durch den Umstand erschwert, daß alle Angaben über Farbe und Intensität vom subjektiven Empfinden des Beobachters abhängig und daher nicht reproduzierbar sind. Dies hat zunächst dazu geführt, die Fluoreszenz der zu untersuchenden Probe mit anderen fluoreszierenden Substanzen bekannter Konzentration zu vergleichen. So bestimmen

---

[146]) Journ. prakt. Chem. (2), **119**, **368** (**1928**).

[147]) Apothekertzg., **1929**, Nr. **81**, und Lumineszenzanalyse.

[148]) Bisher noch nicht veröffentlicht.

J. WERDER und C. ZÄCH[149]) den Gehalt eines Naturweines an Trockenbeerwein durch Vergleich mit Lösungen von Glyzerin in Wasser. J. E. H. WÄGHENING und J. E. HEESTERMANN[150]) das Alter von Hühneiern durch Vergleich der Fluoreszenz ihres Eiweißes mit Gelatine verschiedener Konzentration; G. ORBAN und J. STITZ[151]) bestimmen die Fluoreszenzintensität des Honigs nach den Quecksilberlinien, die durch willkürlich gewählte Filter absorbiert werden.

O. GERNGROSS und H. HÜBNER[152]) gehen bei der Bestimmung des Gehaltes von Gerbstoffextrakten von der Faserfluoreszenz aus und bestimmen zunächst den Fluoreszenzschwellenwert der Reinsubstanz, das ist jene Konzentration, bei der eben noch eine Faserfluoreszenz zu erkennen ist, und vergleichen diesen mit dem Schwellenwerte des auf 1 : 100 verdünnten Extraktes, woraus sich der Fisetingehalt desselben in Prozenten leicht errechnen läßt.

J. EISENBRAND[153]) verwendet zur Schätzung der Intensität einen „fluoreszierenden Stab“, das ist eine mit einer fluoreszierenden Flüssigkeit (Chinin in Schwefelsäure) unten geschlossene Glasröhre, die zentral in ein mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefülltes Becherglas eingesetzt ist; in dem Maße, als diese ultraviolettes Licht absorbiert, erscheint der eingetauchte Stabteil dunkler als der herausragende. Eine deutliche Schwächung tritt ein, wenn 50% des einfallenden Lichtes absorbiert werden; bei einer Schwächung auf 0·1% wird der eingetauchte Stabteil unsichtbar. Von dieser Schwächung ist aber eine solche auf 1% noch deutlich zu unterscheiden; man kann daher beim Vergleiche von zwei verschiedenen knapp nebeneinander stehenden Lösungen desselben Stoffes Schlüsse auf die Konzentration ziehen.

Für wirklich quantitative Bestimmungen der Fluoreszenz müssen die üblichen optischen Instrumente herangezogen werden. L. J. DESHA[154]) und später G. KLEIN und H. LINSER[155]) haben

---

[149]) Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene, **19**, **147** (1928).

[150]) Chem. Weekblatt, **24**, 622 (1927).

[151]) Ztschr. Unters. Lebensmittel, **56**, 467 (1928).

[152]) Collegium, **1927**, 431.

[153]) Ztschr. angew. Chem., **42**, 445 (1929).

[154]) Journ. Amer. chem. Soc., **42**, 1350 (1920).

[155]) Biochem. Ztschr., **219**, 51 (1930).

Nephelometer verwendet. G. E. Trease[156]) benützt Guild-Kolorimeter und stellt aus rotem, blauem und grünem Licht einen Farbfleck derselben Farbe her, die die Probe zeigt. F. Perrin[157]) verwendet ein Photometer mit Graukeil, mit dem die Bilder auf gleiche Intensität gebracht werden; einen solchen Graukeil benützen auch B. T. Squires und J. H. Jeffree[158]) bei ihrem Fluorometer.

V. Mecklenburg und S. Valentiner[159]) leiten einen Teil des konzentrierten Lichtes einer Nernst-Lampe über eine Gipsplatte, drei Nikols und ein total reflektierendes Prisma auf die nicht versilberte Stelle eines Lummer-Brodhun-Würfels, während die andere Hälfte des Lichtes durch die fluoreszierende Flüssigkeit auf dessen versilberten Teil geworfen wird, und stellen durch Drehen des mittleren Nikols auf gleiche Helligkeit ein. J. Hartwich[160]), A. Policard[161]), ferner E. Bayle, R. Fabre und H. George[162]) und J. Plotnikow[163]) verwenden Spektralphotometer. A. A. Hymans van den Bergh und A. J. Hymans[164]) bestimmen die Fluoreszenz des Porphyrins spektrographisch, verschieben zwischen der Substanz und dem Spektrum einen mit einer grünen Flüssigkeit gefüllten keilförmigen Trog aus Glas, bis der Emissionsstreifen gerade ausgelöscht ist, und wählen die Keildicke als Maß für die Konzentration. A. Andant[165]) hat die Spektra photographiert und dann ausphotometriert. J. Ripert und G. Bernheim[166]) verwenden in Verbindung mit dem Panskop (d. i. eine Quecksilberdampfanalysenlampe) einen Komparator, der zum Teil auf dem Prinzip des Kolorimeters, anderseits auf jenem des Differentialphotometers beruht, und beobachten durch Farbfilter (blau, grün, rot und gelb).

---

[156]) Pharmac. Journ., **124**, 264 (1930).

[157]) Compt. rend. Acad. Sciences, **178**, 2252 (1924).

[158]) Journ. scient. instrum., **5**, 273 (1928).

[159]) Physikal. Ztschr., **15**, 267 (1914).

[160]) Wiener Akademieber., **122**, Abt. IIa (1913).

[161]) Ber. ges. Physiol., **35**, 3. 1926.

[162]) Chim. et Ind., **17**, 179 (1927).

[163]) Ztschr. Elektrochem., **55**, 434 (1929).

[164]) Dtsch. Med. Wochenschr., **54**, 1492 (1928).

[165]) Compt. rend. Acad. Sciences, **184**, 1068 (1927).

[166]) Ann. Fals., **22**, 459 (1929).

Das Zeiß'sche Stufenphotometer wurde von W. Sprösser[167]), H. P. Kaufmann[168]), A. Janke und H. Lacroix[169]), E. Beutel und A. Kutzelnigg[170]) verwendet.

Von mir[171]) wurde der Versuch gemacht, aus den Messungen am Stufenphotometer gegen eine beleuchtete Barytweißplatte die ermittelte Farbe in ein dem Koenig'schen Farbendreieck ähnliches Dreieck einzutragen und dadurch zu definieren.

Von mehreren der vorgenannten Autoren wurden auch Untersuchungen über den Zusammenhang der Fluoreszenz und Konzentration einer Lösung studiert. Während jedoch Mecklenburg und Valentiner, dann Hattwich und auch Desha eine annähernde Proportionalität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration feststellten, fanden Fabre und Mitarbeiter und ebenso Klein und Linser, daß bei abnehmender Konzentration ein Optimum der Fluoreszenz existiert. Daraus ergibt sich, daß für jede gemessene Intensität zwei Maxima existieren würden, was die analytische Auswertung der Fluoreszenzmessung erschwert.

Nach Fabre (l. c.), ebenso auch nach A. Fischer[172]) existiert für schwefelsaures Chinin ein solches Optimum. I. Eisenbrand[173]) hat dasselbe Präparat mit einem von ihm konstruierten Apparat untersucht; er beobachtet von oben her und läßt das Licht horizontal auf die Flüssigkeit einfallen. In diesem Falle sieht man bei stärkeren Konzentrationen nur eine ganz dünne Schicht aufleuchten, die um so breiter wird, je mehr man die Lösung verdünnt. Deshalb erhält man nur richtige Resultate, wenn man, wie schon W. Rohn[174]) empfohlen hat, möglichst dünne Schichten beobachtet, damit das erregende Licht möglichst kleine Wege in der Flüssigkeit zurücklegt und die Erscheinung nicht durch Absorption modifiziert wird. Auch Eisenbrand hat eine ganz geringe Spaltbreite (0,5 mm) gewählt, und die Tröge, welche die Vergleichsflüssigkeit und die zu untersuchende Flüssigkeit enthalten, in der Richtung der Lichtquelle verschiebbar angeordnet. Indem er den Spalt auf die Vorderkante der Tröge einstellt, kann er bei einer von Null nur wenig verschiedenen Schichtdicke beobachten. Die Gleichstellung erfolgt durch einen Graukeil. Im Bereiche seiner Messungen, d. i. bei Verdünnungen von $3{,}4 \cdot 10^{-3}$ bis $3{,}4 \cdot 10^{-6}$ konnte EISENBRAND kein Maximum konstatieren; die Resultate stimmen vielmehr mit der von DESHA gefundenen Proportionalität zwischen Lichtemission und Konzentration überein.

---

[167]) Chem. Umschau, Fette, Öle, Wachs, **35**, 325 (1928).

[168]) Ebenda, **36**, 34 (1929).

[169]) Biochem. Ztschr., **215**, 460 (1929).

[170]) Monatsh. Chem., **57**, 15 (1931).

[171]) M. Haitinger, Mikrochemie, **IX**, 441 (1931).

[172]) Inaug. Diss. Zürich, 1925.

[173]) Ztschr. physikal. Chem., Abt. A, **144**, 441 (1929).

[174]) Ann. Phys. (4), **38** (1914).

Daraus folgt auch, daß nephelometrische Messungen erst von jener Konzentration an richtige Resultate geben, bei der der Querschnitt des Röhrchens voll ausgeleuchtet ist, d. i. beispielsweise nach H. LINSER[175]) für Äsculin bei einer Konzentration von 0,00001%, für Chininsulfat in $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure nach H. ENNEKING[176]) zwischen 0,01 bis 0,0001 gr/ltr. der Fall.

Es hat also den Anschein, daß das beobachtete Maximum der Fluoreszenzintensität nicht tatsächlich existiert, sondern durch die Wechselwirkung von Fluoreszenz und Absorption zustande kommt. Die erhaltenen Resultate sind auch von der verwendeten Apparatur abhängig. H. ENNEKING (l. c.) hat dieselben Substanzen kolorimetrisch, nephelometrisch und mit dem Stufenphotometer von Zeiß untersucht, um jene Konzentrationsbereiche zu finden, für welche diese den Intensitäten nahezu proportional sind, und darauf quantitative Bestimmungen aufgebaut.

Bei solchen Intensitätsmessungen muß darauf geachtet werden, daß die Wasserstoffionenkonzentration bei allen Verdünnungen dieselbe ist, da diese die Intensität wesentlich beeinflußt. L. J. DESHA, R. E. SHERILL und L. M. HARRISON[177]) haben an Alkalisalzen einiger Naphtholsulfonsäuren sowie bei Lösungen von Chininsulfat feststellen können, daß für jede der von ihnen untersuchten Substanzen ein Gebiet von 0,2 Sörensen-Einheiten existiert, in dem eine etwa 70%ige Gesamtänderung der Fluoreszenz eintritt. Deshalb muß für alle Verdünnungen dasselbe Lösungsmittel verwendet werden, das auf denselben p_H-Wert gepuffert ist

---

[175]) Fluorometrie in KLEIN's Handbuch der Pflanzenanalyse, S. 387, Springer Wien 1931.

[176]) Diss. Hannover, 1930.

[177]) Journ. Amer. chem. Soc., 48, 1493 (1926).

(H. Klein und G. Linser l. c.). Aus dieser Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Wasserstoffionen-Konzentration hat H. Linser[177a]) eine Methode abgeleitet, diese selbst fluorometrisch zu bestimmen. Als Indikatoren werden Fluoreszein, Äsculin (mit zwei Umschlagpunkten) und Umbelliferon verwendet; mit diesen läßt sich allerdings nicht der ganze pH-Bereich erfassen. Die äußersten, noch meßbaren Bereiche sind: Äsculin I —2,5, Fluoreszein 2,7—5,5. Äsculin 4,5—7,5, Umbelliferon 5,0—8,0.

Derartige Untersuchungen sind bisher nur mit einer sehr geringen Anzahl von Substanzen durchgeführt worden; und auch bei den wenigen Stoffen sind die Resultate noch keine einheitlichen; trotzdem ist damit ein Weg beschritten worden, der vielleicht dazu führen wird, Fluoreszenzerscheinungen zu quantitativen Untersuchungen verwerten zu können, und dies ist die Richtung, in der die Fluoreszenzanalyse weiterhin durchforscht werden muß: so wertvoll die Einzelbeobachtungen unter Umständen sein können, so erscheint es doch viel wichtiger, die Methodik weiter auszubilden und zu verfeinern.

XII. Besondere Anwendungsbeispiele aus der Mikrochemie.

Nachweis von Aluminium.

Bereits im Jahre 1868 hat F. Goppelsroeder[178]), der damals schon den Ausdruck „Fluoreszenzanalyse" gebrauchte, Tonerde durch die gelbe Fluoreszenz, welche bei Behandeln derselben mit Morin auftritt, nachgewiesen. Fr. Feigl[179]) hat diese Reaktion weiter ausgebildet und 0,28 γ Aluminium im Tropfen erkennen können. E. Schantl (zitiert nach Feigl) konnte noch eine Erfassungsgrenze von 0,0001 γ Aluminium erreichen.

Nachweis von Uran.

J. Papish und L. E. Hoag[180]) haben auf Grund der Beobachtung von E. L. Nichols und M. K. Slattery[181]) festgestellt, daß feste Lösungen mit Spuren von Uran in Natrium- oder Kaliumphosphat,

---

[177a]) Biochem. Ztschr., **244**, 157 (1932).

[178]) Ztschr. analyt. Chem., **7**, 195 (1868).

[179]) Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, Leipzig 1931.

[180]) Proceed. National Acad. Sciences, **13**, 126 (1927).

[181]) Journ. Opt. Soc. America, **12**, 449 (1926).

Borax, Natrium- oder Kalziumfluorid lebhafte Fluoreszenz zeigen und daraus ein Verfahren zum Nachweis dieses Elementes ausgearbeitet. Beim Zusammenschmelzen von Kalium- oder Natriumfluorid mit uranhaltigem Material tritt zitronengelbe Fluoreszenz auf. Bei Verwendung von Natriumfluorid ist die Reaktion im gefilterten Ultraviolett nicht eindeutig, da in diesem Falle auch das Niob aktivierend wirkt; dagegen ist bei Anregung durch einen kondensierten Eisenbogen ohne Filter Uran von Niob durch die verschiedenen Fluoreszenzfarben Gelb, bezw. Blaßblau zu unterscheiden. Bei Verwendung von Kaliumfluorid als Lösungsmittel wird die Reaktion auch in gefiltertem Ultraviolett eindeutig, weil Niob mit Kaliumfluorid nicht aktiviert wird. Empfindlichkeitsgrenze bis zu Konzentrationen 10^{-7}. H. EITEL[182]) weist das Uran im tierischen Organismus durch Veraschen und Überführen in die gelbfluoreszierende Uranylverbindungen durch Abrauchen mit Salpetersäure oder Schmelzen mit Borax nach. Grenzkonzentration bei Verdünnungen von 1 : 500.000.

Nachweis von Cadmium.

Stark verdünnte Lösungen von Cadmiumsalzen geben mit Schwefelwasserstoff eine nur schwache Färbung, die im Ultraviolett deutlich gelb ist. L. F. FAIRHAIL und L. PRODAN[183]) haben darauf eine Methode zum Nachweis sehr geringer Mengen von Cadmium in organischem Material begründet. Zunächst wird die organische Substanz mit Salpeter- und Schwefelsäure zerstört und dann nach Zusatz von etwas Kalzium mit Schwefelwasserstoff gefällt, der Niederschlag gelöst und wieder gefällt und dies zweimal wiederholt. Schließlich wird ein aliquoter Teil mit Kaliumcyanid versetzt, mit Schwefelwasserstoff gefällt und mit Ultraviolett kolorimetriert. Grenzkonzentration 1 : 2,500.000.

Nachweis von Wismut und Mangan.

Bestreicht man eine Wasserstoffflamme mit Wismut oder manganhaltigen Erdalkali-, besonders Kalziumsalzen, so leuchtet diese bei Berührung mit Wismut cyanblau, bei Mangan sattgelb auf (J. DONAU[184]), und zwar können 0,0001 γ Wismut und 0,001 γ Mangan auf diesem Wege nachgewiesen werden.

---

[182]) Arch. exp. Pathol. Pharmakol., **135**, 188 (1928).

[183]) Journ. Amer. chem. Soc., **53**, 1321 (1931).

Nachweis von β-Naphthol.

Versetzt man β-Naphthol mit gleichen Teilen von Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure, so entsteht eine grüne Fluoreszenz, die noch bei Verdünnung von 1 : 100.000 erkennbar ist; α-Naphthol, Phenol, Kresol, Glykol und Kreosot geben keine Fluoreszenz (G. DE HAAS[185]).

Nach COLOMBIER[186]) tritt diese Reaktion bereits mit Schwefelsäure allein auf. Derselbe Autor beschreibt eine Reaktion auf Resorcin, das nach Zusatz von Schwefelsäure und Acetessigsäure lebhaft violett fluoresziert, weiters eine Reaktion auf Apfelsäure durch Überführung derselben in Umbelliferon, Zitronensäure durch Überführen in Acetoncarbonsäure.

Verwendung der Uranylsalze als Reagens.

Y. VOLMAR[187]) hat gefunden, daß die Cl′, Br′, — J′ (CN)′ — SCN′, S″, $[Fe(CN)_6]'''$, ganz besonders aber das J′ion, die Fluoreszenz Uranylnitrat auslöschen, dagegen sind die CLO_3'-, BrO_3'-, NO_3'-, SO_4''- und PO_4'''-ionen nicht wirksam; ebenso die organischen Halogenderivate Chloroform, Bromoform, Tetrachlorkohlenstoff, Chloral usw.

Die Mengen eines wirksamen Ions, die zur Auslöschung der Fluoreszenz ein und derselben Menge UO_2-Ion notwendig sind, verhalten sich wie die Quotienten aus den Atomgewichten und ihrer Wertigkeit. Man kann daher sehr geringe Mengen eines wirksamen Ions, wie CL′, Br′, J′, S″ usw., in Gegenwart der unwirksamen Ionen nachweisen. Auch ist es möglich, Spuren von Mineralhalogeniden in Gegenwart organischer solcher Verbindungen, z. B. Chlorwasserstoff in Chloroform, mit weitaus größerer Empfindlichkeit nachweisen, als der Kodex verlangt. Die große Empfindlichkeit dieser Methode gestattet es, sie vorteilhaft in der Mikrochemie zu verwenden.

---

[184]) Monatsh. Chem., **34**, 949 (1913).

[185]) Pharm. Weekblad, **68**, 29 (1931).

[186]) Ann. Fals., **24**, 89 (1931).

[187]) Arch. Phys. Biolog., **6**, 61 (1927).

REFERATE.

Bestimmung von Chlor und Brom in organischen Substanzen auf acidimetrischem Weg. Von F. VIEBÖCK. *(Aus d. Pharmazeut.-chem. Universitätslaborat. Wien.)* I. Mitteil.: *Mikro-Analyse.* Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch. **65**, 493—501 (1932).

Die Zerstörung der organischen Substanz erzielt Verf. durch Verbrennung mit Chromschwefelsäure nach dem von BAUBIGNY und CHAVANNE (Compt. rend. Acad. Sciences, **136**, 497 [1903]) empfohlenen Verfahren; hierbei entweichen in elementarer Form Chlor und Brom, während gleichzeitig vorhandenes Jod durch $AgNO_3$ als $AgIO_3$ zurückgehalten wird. Als zum Zwecke der Mikrotitration geeignete Absorptionsflüssigkeit für Chlor und Brom erwies sich 3%ige Wasserstoffsuperoxyd-Lösung. Die Absorption des Chlors verläuft in glatter Reaktion unter Bildung von Salzsäure und Sauerstoff.

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HClO + H^{\cdot} + Cl', \quad HClO + H_2O_2 \longrightarrow H^{\cdot} + Cl' + H_2O + O_2$$

Auch durch Absorption des bei der Verbrennung chlorhaltiger Substanzen stets entstehenden ClO_2 entsteht gleichfalls auf 1 Atom Chlor 1 Äquivalent titrierbarer Säure; nach Ansicht des Verf. setzt sich ClO_2 folgendermaßen um:

$$2\,ClO_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,HClO_2 + O_2, \quad HClO_2 + 2\,H_2O_2 \longrightarrow H^{\cdot} + Cl' + 2\,H_2O + 2\,O_2$$

Die Lösung kann daher zwecks Cl-Bestimmung mit Lauge titriert werden. (Auf die Anwesenheit der chlorigen Säure kann aus dem langsamen Ausbleiben einer mit Methylrot gefärbten Absorptionsflüssigkeit geschlossen werden.) Die für die Mikro-Titration erforderliche, vollständige Übertreibbarkeit des Chlors sowie die sichere Zurückhaltung der Schwefelsäure wurde durch viele Versuche erwiesen. Brom verhält sich ebenso wie Chlor, nur liegen hier die Reaktionsverhältnisse viel einfacher. Bei der Verbrennung von Nitrokörpern wirken kleine Mengen mit übergehender Salpetersäure störend. Essigsäure und Azetate hingegen sind ohne Einfluß auf diese Methode.

Zur Kontrolle läßt sich in der mit Lauge austitrierten Lösung das Chlor gravimetrisch als AgCl bestimmen. Einfacher kann jedoch die acidimetrische Titration durch eine spezifische Halogen-Ionen-Bestimmung ergänzt werden, die auf folgenden Tatsachen beruht: Quecksilberoxycyanid verhält sich in wässeriger Lösung wie eine neutral reagierende Verbindung; es genügen wenige Tropfen $^1/_{100}$-n. H_2SO_4, um in 5 ccm gesättigter Lösung von Quecksilberoxycyanid saure Reaktion gegen Methylrot hervorzurufen. Hingegen sind wegen der besonderen Affinität des Chlors zum Quecksilber nahezu stöchiometrische Mengen HCl erforderlich, um Farbumschlag des Indikators zu bewirken. Es handelt sich in beiden Fällen um Gleichgewichte, die aber recht verschiedene Lage aufweisen:

$$2\,Hg(CN)(OH) + H_2SO_4 \rightleftarrows Hg(CN)_2 \,.\, HgSO_4 + 2\,H_2O$$

hydrolysiert stark.

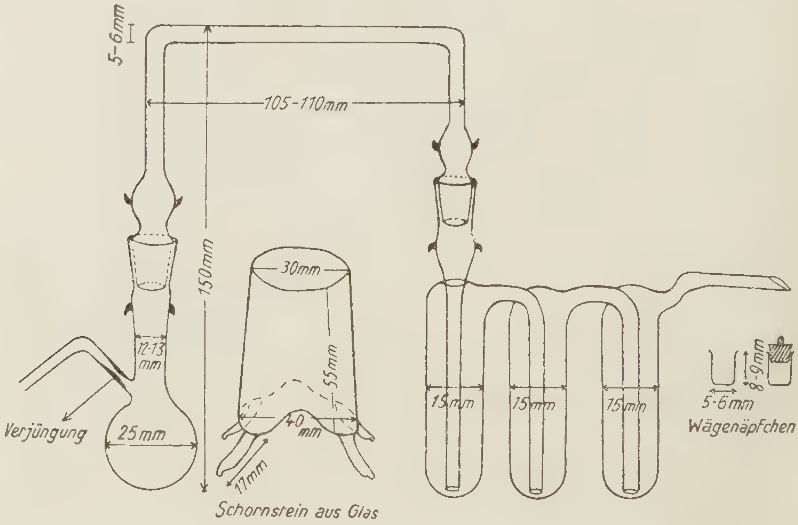
$$2\,Hg(CN)(OH) + 2\,HCl \rightarrow Hg(CN)_2 \,.\, HgCl_2 + 2\,H_2O$$

hydrolysiert kaum.

Wenn man also zu einer natriumchloridhaltigen Lösung Quecksilberoxycyanid hinzufügt, so entsteht gemäß dem Gleichgewicht

$$2\,Hg(CN)(OH) + 2\,NaCl \rightarrow Hg(CN)_2 \,.\, HgCl_2 + 2\,NaOH$$

die äquivalente Menge Lauge, die mit Säure titrierbar ist. Da sich der Äquivalenzpunkt mit der Temperatur und Verdünnung verschiebt, muß bei Gegenwart eine Vergleichslösung titriert werden. Zwecks Bromid-Bestimmung ist eine viel geringere Menge Quecksilberoxycyanid ausreichend und die Vergleichslösung ganz entbehrlich.



Reagenzien: 1. „Perhydrol Merck, garantiert säurefrei“ wird auf das 10fache verdünnt und bis zur alkalischen Farbe gegen Methylrot neutralisiert. — 2. Methylrot: Die Indikatorlösung wird durch Lösen von 300 mg fein zerriebenem Methylrot in 10 ccm $^1/_{10}$-n. Lauge und 100 ccm Wasser in der Siedehitze bereitet; es wird filtriert und schließlich auf 200 ccm aufgefüllt. — 3. Silbersulfathaltige, konz. Schwefelsäure: 10 g Silbersulfat werden in 400 g H_2SO_4 aufgelöst. — 4. $K_2Cr_2O_7$, halogenfrei. — 5. $^1/_{100}$-n. möglichst kohlensäurefreie Lauge, dargestellt durch Verdünnen von $^1/_{10}$-n. Lauge. — 6. $^1/_{100}$-n. H_2SO_4. — 7. $^1/_{100}$- oder $^1/_{10}$-n. HCl. — 8. Gesättigte Quecksilberoxycyanid-Lösung. (Das Handelsprodukt wird aus heißem Wasser umkristallisiert.)

Ausführung der Analyse: Von halogenhaltigen Substanzen wird soviel eingewogen, daß sich 1,5 bis 3 mg Cl, bezw. etwa 5 mg Br. entwickeln. Luftbeständige Substanzen werden im offenen Näpfchen, hydroskopische in mit Stopfen verschlossenem Näpfchen eingewogen. Das seitliche Ansatzrohr des Kölbchens wird durch ein Natron-Kalk-Rohr und durch eine mit H_2SO_4 gefüllte Waschflasche mit einem kleinen, mit Luft gefüllten Gasometer verbunden. Das Kölbchen wird mit 0,5 bis 1 g $K_2Cr_2O_7$ und mit Hilfe eines Trichters mit soviel Silbersulfat-Schwefelsäure beschickt, daß es bis zu ⅔ gefüllt ist. (Der Schliff und die oberen Partien des Halses dürfen nicht mit der silberhaltigen H_2SO_4 benetzt werden.) Das Absorptionsgefäß wird mit H_2O_2 gefüllt; das erste Gefäß soll bis zu ⅔, das dritte bis zumindest ⅓ gefüllt sein; hierzu sind etwa 15 bis 17 ccm H_2O_2-Lösung erforderlich. Nachdem alle Teile des Apparats verbunden sind, wird ein Luftstrom durchgeleitet (1 Blase in der Sekunde) und die Substanz samt dem Näpfchen mit Hilfe einer Pinzette in den Kolben fallen gelassen; durch Schütteln des Apparats wird eine gleichmäßige Verteilung der Substanz bewirkt. Nun wird der Mikrobrenner (Öffnung: 6 cm unterhalb des Kölbchens) auf die kleinstmögliche Flamme eingestellt. Nach 1 bis 2 Minuten setzt Gasentwicklung ein; die meist sehr lebhafte Zersetzung ist oft schon nach 10 Min. beendigt. Sobald die Kohlensäure vertrieben ist, wird das Absorptionsgefäß abgenommen und der gesamte Inhalt desselben in einen ERLENMEYER-Kolben gespült. Nach Zusatz von genügend Methylrot wird auf rein gelb titriert.

Zwecks Kontrollbestimmung bringt man in einen anderen, gleich großen ERLENMEYER-Kolben so viel Wasser, als der titrierten Probe entspricht, ferner 100 ccm Quecksilberoxycyanid-Lösung und schließlich eine der zuerst verbrauchten Menge Lauge äquivalente Menge $^1/_{100}$-n., bezw. $^1/_{10}$-n. HCl. Nun werden zur Probelösung auch 10 ccm Quecksilberoxycyanid-Lösung hinzugefügt und mit $^1/_{100}$-n. H_2SO_4 bis zu dem Farbton titriert, den die mit der gleichen Menge Indikator versetze Vergleichslösung zeigt. A. BONDI.

Bestimmung von Chlor und Brom in organischen Substanzen auf acidimetrischem Wege. Von F. VIEBÖCK. II. Mitteil.: *Halbmikrobestimmung.* Ber. d. Dsch. Chem. Gesellsch., 65, 586—588 (1932).

Die in der I. Mitteil. (vergl. vorstehendes Referat) beschriebene Methode zur Bestimmung des Chlors und Broms kann auch zur Analyse von Substanzmengen angewendet werden, die auf einer gewöhnlichen Analysenwaage mit hinreichender Genauigkeit wägbar sind. Als untere Grenze der Einwaage wählt man bei den halogenreichsten Substanzen etwa 20 mg, als obere Einwaage etwa 50 mg für halogenarme Verbindungen. Der Apparat stellt lediglich eine Vergrößerung des früher angegebenen dar. Von den Reagenzien müssen etwas größere Mengen angewendet werden: der Zersetzungskolben wird mit etwa 2 g $K_2Cr_2O_7$ und 10 bis 12 ccm Silbersulfat-Schwefelsäure beschickt. In die Vorlage bringt man 30 bis 40 ccm frisch gegen Methylrot neutralisierte 3%ige H_2O_2 Lösung. Zur Titration werden $^1/_{40}$-n.-Säure und -Lauge verwendet. Zur Kontrolltitration für Chlor verwendet man etwa 20 bis 25 ccm gesättigte Quecksilberoxycyanid-Lösung. Brom kann mittels argentometrischer Titration unter Verwendung eines Adsorptions-Indikators bestimmt werden. Infolge der größeren Menge der vorgelegten Wasserstoffsuperoxyd-Lösung und der gleichzeitig länger anhaltenden Bildung von Kohlendioxyd kann die Vorlageflüssigkeit viel schwerer von der absorbierten Kohlensäure befreit werden; die Kohlensäure wird daher am besten erst gegen Ende der Titration durch Auskochen entfernt. Ansonsten wird die Halbmikrobestimmung ebenso wie die Mikrobestimmung ausgeführt. Eine große Anzahl von Beleganalysen erweisen die Brauchbarkeit dieser Methode. A. BONDI.

Mikro-Molekulargewichts-Bestimmungen nach der Methode der molaren Schmelzpunkts-Erniedrigung. Von J. PIRSCH. (Aus dem Pharmazeut.-chem. Universitäts-Laboratorium in Wien.) *Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, 65, *S. 862—865 (1932).*

Das bekannte von K. RAST (B. 55, S. 1053 und 3727 [1922]) beschriebene Verfahren der Molekulargewichts-Bestimmung organischer Substanzen verwendet Campher als Lösungsmittel. Das Molekulargewicht von Stoffen, die in Campher wenig löslich sind oder bei dem hohen Schmelzpunkt des Camphers Molekülspaltung erleiden, kann daher nach der RAST'schen Methode nicht bestimmt werden.

Verf. konnte nun einige Stoffe ausfindig machen, die gutes Lösungsvermögen, große molekulare Schmelzpunktserniedrigung, teilweise auch niedrigen Schmelzpunkt besitzen und sich daher sehr gut als Lösungsmittel für Molekulargewichts-Bestimmungen eignen. Solche Stoffe sind: Campher, Schmelzpunkt: 49°, Molare Schmelzpunkts-Erniedrigung E = 31,08; Pinen-Chlorhydrat, Schmp.: 124°, E = 45,4; Pinen-Dibromid, Schmp.: 170°, E = 80,9; Borneol, Schmp.: 204°, E = 35,8.

Zur praktischen Durchführung der Molekulargewichts-Bestimmung verwendet Verf. eine etwa 5 cm lange Kapillare, deren lichte Weite am zugeschmolzenen Ende 3 mm beträgt und die gegen das offene Ende etwas konisch erweitert ist. In dieselbe werden etwa 0,5 bis 1,1 mg der zu untersuchenden Substanz und hernach 8 bis 12 mg Lösungsmittel eingewogen. Das Solvens wird entgegen den RAST'schen Angaben nicht in die Kapillare gestopft, sondern dasselbe wird durch Auffallenlassen des Schmelzpunktsröhrchens auf eine Marmorplatte in kleinen Körnern auf den flach abgeschmolzenen Boden der Kapillare gebracht. Dadurch kann die Lösungssubstanz keinesfalls an die Wand des Röhrchens ankleben. Das so gefüllte Schmelzpunktsröhrchen wird zugeschmolzen, am Thermometer befestigt und nun in einem Wasserbad erwärmt, das folgende Form besitzt: Ein Glaszylinder von 8 cm Durchmesser und 14 cm Höhe ist mit einem zirka 1½ cm hohen und 24 mm breiten Tubus-Ansatz versehen, der sich im nächsten Abstand vom Zylindermantel 14 mm entfernt befindet. Das Glasgefäß ist 12 bis 13 cm hoch, fast ganz mit Wasser gefüllt und steht auf 2 Draht-Asbestplatten auf, die beide in der Mitte um 90° abgeknickt sind. Die Asbestplatten sind mit ihren abgeknickten Teilen in einem Abstand von ½ cm einander zugekehrt, wodurch eine Wärme-Übertragung von einem Drahtnetz zum andern fast völlig verhindert wird. Etwa 2° unterhalb des Schmelzpunktes wird das Thermometer mit dem Schmelzpunktsröhrchens in ein anderes Wasserbad gebracht, dessen Temperatur etwa 5 bis 10° oberhalb des erwarteten Schmelzpunkts liegt. Durch dieses schwache Überhitzen sowie durch nun folgendes leichtes Schwenken des Thermometers in horizontaler Lage wird der Inhalt des Röhrchens vollkommen homogen gemacht. Nun wird das Thermometer in jenes Wasserbad übersetzt, in dem nunmehr die Schmelzpunkts-Bestimmung durchgeführt wird. Bei langsamer Temperatur-Steigerung (0,2° pro Minute) kann man ohne Schwierigkeit den richtigen Schmelzpunkt feststellen, da auf diese Weise keine Entmischung der Schmelze eintreten kann. Als Schmelzpunkt ist jener Wärmegrad anzusehen, bei dem gerade die letzten Kristallfäden verschwinden. A. BONDI.

Mikro-Molekulargewichts-Bestimmungen von Flüssigkeiten. Von J. PIRSCH *Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, 65, *S. 865—868 (1932).*

Während alle bisher bekannten Methoden der Mikro-Molekulargewichts-Bestimmung zur Analyse flüssiger Substanzen ungeeignet sind, ermöglicht das von PIRSCH (siehe vorstehendes Referat) beschriebene Verfahren die exakte Durchführung der Molekulargewichts-Bestimmung von Flüssigkeiten mit großer Dampftension. Bei der Einwaage von Flüssigkeiten ist auf die Ausschaltung jeglichen Gewichtsverlustes durch Verdunstung sorgfältig zu achten, was Verf. folgendermaßen erreicht: Eine einseitig zugeschmolzene Kapillare mit zirka 1 mm lichter Weite wird in einem Abstand von 8 bis 9 mm vom zugeschmolzenen Ende zu einer überaus feinen, etwa 10 mm langen Haar-Kapillare ausgezogen. Die Kapillare wird mit ihrem haarförmigen Auszug in ein kleines Schälchen getaucht, das einige Millimeter hoch mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt ist; die Kapillare soll mit ihrem breiten Teil ungefähr 6 mm aus dem Schälchen herausragen. Wenn man den herausragenden Kapillarteil mit einer erwärmten Platin-Pinzette erfaßt, die Kapillare für einige Sekunden emporhebt und dann wieder mit der Spitze nach abwärts in die Flüssigkeit taucht, so wird beim Wiederabkühlen Flüssigkeit in die Kapillare eingesaugt. Wenn man soviel Flüssigkeit aufsaugen läßt, daß die Kapillare 1 bis 1½ mm hoch mit Flüssigkeit erfüllt ist, so wird nachher anstatt Flüssigkeit Luft durch die Kapillare nachgesaugt. Diese Luftpolsterung verhindert ein Entweichen von Flüssigkeit in Dampfform. Auch nach halbstündigem Verweilen des Röhrchens auf der Schale einer Mikrowaage ist keine Gewichtsabnahme bemerkbar.

Diese Art der Einwaage von Flüssigkeiten empfiehlt PIRSCH auch für Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmungen sowie für Halogen-, Schwefel- und Stickstoff-Bestimmungen. Da für diese Mikro-Analysen größere Einwaagen erforderlich sind, ist der bauchige Teil der Kapillare etwas größer zu wählen.

Die so mit der Flüssigkeit gefüllte Kapillare wird bei der Molekulargewichts-Bestimmung mit der feinen Spitze nach abwärts in ein 7 cm langes Schmelzpunktsrohr fallen gelassen. Nun wird das Schmelzpunktsrohr rasch zugeschmolzen. Vollständige Durchmischung der Analysensubstanz mit dem Lösungsmittel wird folgendermaßen erreicht: Durch schwaches Erhitzen des bauchigen Teils der ausgezogenen Kapillare wird der Inhalt derselben auf das Lösungsmittel hin austreten gelassen. Nun wird das Lösungsmittel zum Schmelzen gebracht, während sich die Kapillare gleichzeitig wieder abkühlt; daher wird durch die feine Kapillare

Lösungsmittel wieder eingesaugt. Dieser Vorgang ist mehrmals zu wiederholen. Bei der nun folgenden Schmelzpunkts-Bestimmung hat das Auflösen des letzten Kriställchens in der Kapillare und im Schmelzpunktsrohr gleichzeitig zu erfolgen.

Die Analyse öliger, dickflüssiger Substanzen führt Verf. folgendermaßen durch: In einem 8 bis 9 cm langen, höchstens 2,5 mm breiten, einseitig zugeschmolzenen Röhrchen befindet sich, genau zentriert, ein 0,7 mm starkes Glasstäbchen. Dasselbe soll mit seiner Spitze 1 bis 1,5 mm über den Rand des Glasröhrchens herausragen. Die Stäbchenspitze wird in die zu analysierende ölige Substanz eingetaucht, wobei soviel Substanz am Stäbchen haftet, als zur Analyse erforderlich ist. Nun wird das Stäbchen mit der daran befindlichen Substanz in das Schmelzpunktsrohr so eingesenkt, daß die Substanz nicht die Glaswand desselben beschmiert, sondern nur der Boden des Rohres benetzt wird. Nach Wägung des Öls erfolgt in der schon früher erwähnten Weise die Einwaage des Lösungsmittels.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind sehr zufriedenstellend. A. BONDI.

Ein katalytischer Nachweis für höchst verdünnte Silberlösungen (zugleich Vorlesungsversuch). Von F. L. HAHN. (Aus d. Chem. Institut d. Universität Frankfurt a. M.) *Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, **65**, *840—842 (1932).*

Es wird ein katalytischer Silbernachweis beschrieben, der es gestattet, außerordentlich kleine, olygodynamische Ag-Konzentrationen zu erkennen.

F. FEIGL *(Mikrochemie*, **X**, *305 [1931])* hat festgestellt, daß die durch Phenylhydrazin bewirkte, für sich sehr langsam verlaufende Reduktion von Kalomel zu metallischem Quecksilber durch Silberspuren außerordentlich beschleunigt wird; diese katalytische Wirksamkeit kleinster Ag-Mengen wurde von F. FEIGL für einen sehr empfindlichen Nachweis dieses Elements ausgewertet. (Erfassungsgrenze: 0,5 γ pro Liter.)

Verf. verwendet anstatt Phenylhydrazin Natriumhypophosphit als Reduktionsmittel, wodurch es ihm gelingt, die Beeinflussung der vorhergehenden Reduktion von Sublimat zu Kalomel zu erfassen. Unter Einhaltung der folgenden Arbeitsvorschrift und bei Verwendung des von F. L. HAHN *(Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, **63**, *1543 [1930])* beschriebenen Farbton-Nephelometers können noch 0,1 γ pro Liter erkannt werden.

Lösungen: Sublimat: 11 g $HgCl_2$ werden zu 200 ccm heiß gelöst und dabei mit so viel Bromwasser versetzt, daß die Lösung gerade gelblich gefärbt ist.

Hypophosphit: 50 ccm molares Natriumhypophosphit, 3·4 ccm $^1/_{15}$-molare Phosphorsäure und 16·6 ccm $^1/_{15}$-molares prim. Kaliumphosphat werden auf 200 ccm verdünnt; die Lösung ist auf $p_H = 3$ gepuffert.

Gefäße. Alle Gefäße werden unter 2-n. HCl aufbewahrt, die durch Brom deutlich gelb gefärbt ist.

Versuch. In zwei Bechergläsern von je 50 ccm kommen je 1 ccm Sublimat, in zwei weitere je 2 ccm Hypophosphit und 20 ccm reines Wasser bezw. Probe. Wasser und zu prüfende Lösung werden gleichzeitig in die Sublimat-Gläser gegossen und darauf zum Mischen zwei- bis dreimal umgeschwenkt. Die Proben werden nun in Reagenzgläser umgefüllt und in das Nephelometer gestellt. Bei 1 γ

Ag/l ist der Unterschied nach drei bis vier Minuten gut erkennbar. Bei fünf- bis zehnfacher Ag-Konzentration ist die Trübung nach ein bis zwei Minuten ohne Hilfsmittel kenntlich, während die silber-freie Lösung völlig klar bleibt.

A. BONDI.

Mikro-Molekulargewichts-Bestimmungen nach der Methode der molaren Schmelzpunktserniedrigung. (II. Mitteil.) Von J. PIRSCH. (Aus d. Pharmazeut.-chem. Universitäts-Laborat. in Wien.) *Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, **65**, *1227—1229 (1932).*

In Fortführung seiner Untersuchungen *(Ber. d. Dtsch. Chem. Gesellsch.*, **65**, *862, 865 [1932]; Mikrochemie*, **X** *[1932])* hat Verfasser einige weitere Lösungsmittel mit hohen molaren Schmelzpunktserniedrigungen aufgefunden, die für Mikro-Molekulargewichts-Bestimmungen geeignet sind. Bornylamin, Schmp. 164°, molare Schmelzpunktsdepression E = 40·6, eignet sich besonders zur kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung organischer Basen (Alkaloide). Bei Verwendung von Bornylamin, ebenso von Pinen-dibromid, erhält Verf. auch bei kristallwasserhaltigen Substanzen sehr gute Werte, da Wasser in beiden Lösungsmitteln ganz ungelöst bleibt und den Schmelzpunkt daher nicht erniedrigt. Bei Verwendung von Pinen-dibromid kann man das Kristallwasser durch einen kapillaren Auszug des Schmelzpunktsröhrchens entwickeln lassen, während für Bornylamin infolge dessen Flüchtigkeit nur zugeschmolzene Röhrchen benützt werden können.

Camphen-dibromid eignet sich trotz seiner besonders großen Molardepression von zirka 115 weniger für Molekulargewichtsbestimmungen, da die beiden Bromatome im Camphen-dibromid leicht beweglich sind und da bei allen bisher untersuchten Testsubstanzen stark differierende Werte der Molardepression gefunden wurden.

A. BONDI.

Über mögliche Fehler bei Bestimmung von Nitraten nach Methode von Grandval-Lajoux. Von B. A. SKOPINZEW. *Journ. angew. Chemie (russ.)*, 3, *747—758 (1930).* (Erisman, Sanit. Inst., Moskau.)

Bei Eindampfen von Wasser, bezw. von verdünnten Nitratlösungen in einem Wasserbade, welches mit Leuchtgasflamme erwärmt wird, werden wesentliche Verluste von Nitrat beobachtet. Sie sind auf die in Leuchtgas enthaltenden Schwefelverbindungen zurückzuführen; wenigstens wurde die Bildung von Sulfiten bei Eindampfen der Lösungen festgestellt. Der Verlust findet nicht statt, wenn das Eindampfen auf einem elektrischen Bade ausgeführt wird, oder wenn die Lösung mit Alkali versetzt wird (0,5 bis 1 cm^3 0,1-n Lauge auf 100 cm^3 Wasser).

Die Anwesenheit von Ammoniumsalzen in Wasser kann auch Nitratverlust bei Eindampfen zur Folge haben. Dieser Fehler wird auch durch Zusatz geringer Alkalimengen beseitigt.

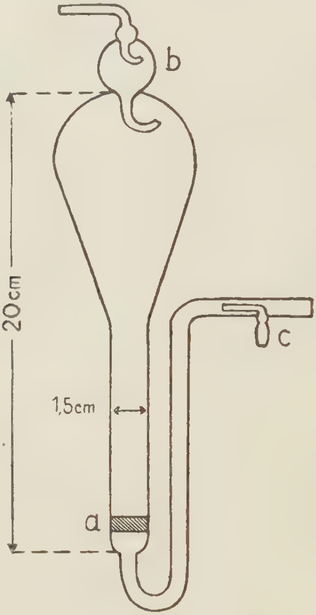
EUGEN SCHILOW.

Eine neue Methode zur Bestimmung von kleinen Quecksilbermengen in der Luft. Von B. L. MOLDAWSKY. *Journ. angew. Chemie (russ.)*, 3, *955—964 (1930).* (Inst. für Gewerbehygiene und Unfallverhütungstechnik, Leningrad.)

Verf. untersucht die kolorimetrische Diphenylcarbazidmethode von STOCK und

POLAND zur Bestimmung von Quecksilber in der Luft. (Ztschr. angew. Chem., **39**, 791 [1926]; STOCK u. ZIMMERMANN, Ztschr. angew. Chem., **41**, 546 [1928].)

Nach dem STOCK'schen Verfahren wird Quecksilber in U-Röhren unter Kühlung mit flüssiger Luft aufgefangen und in Chlorwasser gelöst. Die Entfernung von überschüssigem Chlor aus der Lösung wird durch Durchströmen von Luft erreicht. Dabei bildet sich aber in der Lösung Salzsäure, welche die Bestimmung von Quecksilberchlorid mit Diphenylcarbazid, bezw. Diphenylcarbazon stört. (Vergl. THILENIUS u. WINZER, Ztschr. angew. Chem, **42**, 429 [1929].) Nach dem mehrstündigen Luftdurchsaugen können sogar die erhaltenen Quecksilberchloridlösungen Standardmischungen von $HgCl_2$ und Diphenylcarbazid entfärben.



Verf. beseitigt den Fehler der STOCK'schen Methode, indem er die Lösungen von $HgCl_2$, bezw. $HgBr_2$ in Chlorwasser in einem Vakuumexsikkator verdunsten läßt. Wenn die Lösungen vorher mit Chlor gesättigt waren, findet kein nennbarer Verlust von Quecksilber statt; lediglich wäßrige Lösungen von $HgCl_2$, bezw. $HgBr_2$ verlieren wesentliche Hg-Mengen bei Verdunsten im Exsikkator. Durch Zusatz von etwas Salzsäure wird der Verlust vermindert, aber nicht ganz beseitigt. Nach dem Verdunsten-Verfahren kann man Quecksilber in sehr großen Verdünnungen (z. B. 1 : 10,000.000) quantitativ bestimmen.

Zum Ersatz des STOCK'schen Verfahrens zum Auffangen von Quecksilber mit Hilfe flüssiger Luft hat der Verfasser ein Absorptionsverfahren ausgearbeitet.

beruhend auf der Verwendung von Bromwasser, welches beständig mit Bromdämpfen gesättigt wird.

Zu diesem Zwecke dient der in der Figur dargestellte Apparat. Die zu untersuchende Luft wird durch Glasfilter a, auf welchem 4 cm³ Wasser gebracht sind, durchgesaugt. Der doppelte Aufsatz b verhütet die Flüssigkeit vor Verspritzen. Zur Sättigung der Luft mit Bromdampf dient die Seitenröhre c, welche mit einer Waschflasche, enthaltend flüssiges Brom und Wasser, verbunden ist. Bei der Geschwindigkeit des Luftstromes von 100 bis 300 l pro Stunde muß man zwei bis vier Blasen in einer Sekunde durch die Bromflasche durchsaugen.

Zur Bestimmung von 1 γ Hg in 1 m³ Luft genügt das dreistündige Durchströmen von Luft durch den Absorptionsapparat. Bei Geschwindigkeit des Luftstroms bis zu 360 l/st wird Quecksilber völlig zurückgehalten.

Nach der Beendigung der Absorption wird Absorptionsflüssigkeit in ein Waagegläschen ausgeblasen und der Apparat mit 2 bis 4 cm³ Wasser abgespült. Absorptionsflüssigkeit und das Waschwasser wird mit Chlor gesättigt und im Vakuumexsikkator über KOH verdunstet. EUGEN SCHILOW.

Eine empfindliche mikrochemische Reaktion von Kupfersalzen und einiger anderen Schwermetalle. Von I. M. KORENMAN. *Journ. Chem. Industrie (russ.),* 8, *276 (1931).* (Chem. Pharm. Inst., Odessa.)

Schwermetallsalze können mikrochemisch durch Pikrinsäure nachgewiesen werden, welche mit ihnen charakteristische kristallinische Niederschläge bildet. Als Reagens wird die Mischung von 2 Teilen gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung und 1 Teil 10%ig. Ammoniak verwendet.

Erfassungsgrenzen der Reaktion: Cu — 0,05 γ; Ag — 20 γ; Ni — 0.1 γ; Cd — 1 γ; Hg — 0,15 γ; Au — 0,2 γ. EUGEN SCHILOW.

Tüpfelreaktionen einiger organischen Verbindungen. Von I. M. KORENMAN. *Journ. Chem. Ind.,* 8, *508—510 (1931).* (Chem. Pharm. Inst., Odessa.)

Nach einer kurzen Besprechung der Vor- und Nachteile der Tüpfelmethode gibt Verf. eine Anleitung zum Nachweis einiger aromatischen Amine und Aldehyde mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Zum Nachweis werden bekannte makrochemische Reaktionen herangezogen.

Anilin. 1. Ein Tropfen der Anilinsalzlösung wird auf mit gesättigter Chlorkalklösung befeuchtetem Filtrierpapier aufgetragen: blauvioletter, darauf rotbrauner, bald verschwindender Fleck. Erf.-Gr.: 1 γ Anilinsulfat. Wenn nach dem Verschwinden der blauen Färbung das Papier über Ammoniumsulfid gehalten wird, so erscheint eine rosa bis rote Färbung. Erf.-Gr.: 0,25 γ Anilinsulfat. Benzidin in essigsaurer Lösung gibt mit Chlorkalk einen blauen Fleck. Erf.-Gr.: 0,02 γ. Sulfanilsäure gibt keine Färbung mit Chlorkalklösung, aber die Behandlung des Fleckes mit Ammoniumsulfid-Dämpfen erzeugt eine rosa Färbung. Erf.-Gr.: 0,7 γ.

2. Auf Filtrierpapier werden je 1 Tropfen des Anilinsalzes, Chlorkalklösung und wäßriger Phenollösung gebracht. Bei Behandlung des Fleckes mit NH_3-Dämpfen wird der Rand des Fleckes blau. Erf.-Gr.: 0,75 γ Anilinsulfat. Sulfanilsäure gibt dieselbe Reaktion, Benzidin nicht.

Sulfanilsäure. 1. Mit Sulfanilsäurelösung befeuchtetes Filtrierpapier wird mit essigsaurer α-Naphthylaminlösung, dann mit $NaNO_2$ betüpfelt — ein gelbbrauner, rotumrandeter Fleck. Erf.-Gr.: 0,1 γ. Anilin stört nicht.

2. Ein Tropfen Sulfanilsäurelösung wird auf Filtrierpapier mit Stickoxyden behandelt, dann mit α-Naphtholatlösung betüpfelt — ein roter Fleck. Erf.-Gr.: 0,02 γ. Anilin gibt bei dieser Probe rotbraune oder himbeerrote Färbung.

Diphenylamin. Ein Tropfen alkoholischer Diphenylaminlösung wird auf Papier mit schwefelsaurer $K_2Cr_2O_7$-Lösung versetzt, wonach sofort ein blauer Fleck erscheint. Erf.-Gr.: 0,1 γ. In Gegenwart von Anilin kann eine dunkelblaue oder dunkelgrüne Färbung nur nach einigen Minuten erscheinen. Benzidin stört nicht.

Benzidin. 1. Ein Tropfen essigsaurer Benzidinlösung wird auf Papier mit $K_2Cr_2O_7$-Lösung behandelt: dunkelblauer Fleck. Erf.-Gr.: 0,05 γ. Verdünnte Mineralsäuren entfärben den Fleck. Man kann auch den feuchten Fleck mit Bromdämpfen oder Stickoxyden behandeln.

2. Filtrierpapier wird nacheinander mit verdünnter $CuSO_4$-Lösung, mit essigsaurer Benzidinlösung, dann mit KCN betüpfelt: ein dunkelblauer Fleck. Erf.-Gr.: 0,1 γ. Anilin stört nicht.

3. $AuCl_3$-Lösung gibt mit Benzidin auf Filtrierpapier einen rotbraunen, blauumrandeten Fleck. Erf.-Gr.: 0,0075 γ. Andere Amine erzeugen ähnliche Färbungen.

α-Naphthylamin. 1. Ein Tropfen salzsaurer α-Naphthylaminlösung wird auf Papier mit schwefelsaurer $K_2Cr_2O_7$-Lösung betüpfelt: ein rosavioletter, violetter, dann blauer Fleck. Erf.-Gr.: 0,3 γ salzsaures α-Naphthylamin. β-Naphthylamin stört nicht.

2. Mit salzsaurer α-Naphthylamin befeuchtetes Papier wird nach dem Betüpfeln mit Sulfanilsäure-$NaNO_2$-Lösung intensiv violettrot. Erf.-Gr.: 0,02 γ salzsaures α-Naphthylamin. β-Naphthylamin stört nicht.

β-Naphthylamin. Ein mit alkoholischer Lösung von salzsaurem β-Naphthylamin und mit Essigsäure befeuchtetes Papierstreifchen wird in Furfuroldämpfe gebracht oder mit essigsaurer Furfurollösung befeuchtet. Nach einiger Zeit entwickelt sich violette oder blauviolette Färbung. Erf.-Gr.: 0,3 γ, β-$C_{10}H_7NH_3Cl$. α-Naphthylamin stört nicht. Anilin kann bei dieser Probe die rote, Benzidin die blaue Färbung erzeugen.

Phenylhydrazin. Auf Filtrierpapier wird ein Tropfen gesättigter Ammoniummolybdat-Lösung, dann ein Tropfen salzsaures Phenylhydrazin aufgetragen. Nach dem Behandeln des Fleckes mit Ammoniakdämpfen erscheint eine grünblaue oder dunkelblaue Färbung. Erf.-Gr.: 0,1 γ $C_6H_5N_2H_4Cl$.

Pyridin. Ein Tropfen Pyridinlösung wird auf Filtrierpapier mit einem Tropfen Anilin, bezw. Anilinwasser befeuchtet und mit einem Tropfen Bromcyan (konz. $KCN + Br_2$) behandelt; hierbei entsteht ein gelber, gelboranger, dann rotvioletter Fleck. Bei einer verdünnteren Pyridinlösung erscheint langsam rosa Färbung. Erf.-Gr.: 0,1 γ.

Formaldehyd. 1. Man bringt auf mit Formaldehydlösung befeuchtetes Papier einige Körnchen von salzsaurem Phenylhydrazin und hierauf einen Tropfen einer Nitroprussidnatrium-Lösung. Bei Antüpfeln des Randes des Fleckes mit konz. NaOH erscheint eine blaue, bald verschwindende Färbung. Ohne Formaldehyd geben die Reagenzien allein rotbraune oder gelbe Färbung. Erf.-Gr.: 0,1 γ. Acetaldehyd stört nicht.

2. Ein Formaldehydlösung-Fleck wird mit gepulvertem Phenylhydrazinchlorhydrat bestreut und mit je einem Tropfen 5% $K_3Fe(CN)_6$ und konz. HCl angetüpfelt. Formaldehyd erzeugt einen rotvioletten Fleck. Die Reagenzien allein geben einen hellbraunen Fleck. Filtrierpapier darf kein Eisen und Kupfer enthalten. Erf.-Gr.: 0,04 γ CH_2O. Acetaldehyd gibt die Reaktion nicht.

3. Ein Formaldehydlösung-Fleck wird mit Phloroglucinlösung, dann mit NaOH befeuchtet: rotbrauner Fleck. Erf.-Gr.: 0,03 γ CH_2O.

Acetaldehyd. 1. Auf Filtrierpapier wird je ein Tropfen Acetaldehydlösung, Pyperidin und Natriumnitroprussidlösung gebracht. Am Rande des feuchten Fleckes erscheint blaue nach einiger Zeit verschwindende Färbung. Beim Zusatz von Lauge schlägt die blaue Farbe in Hellrot um. Erf.-Gr.: 0,4 γ. Formaldehyd stört nicht. Aceton kann hellrosa Färbung geben. Acrolein soll nach LEWIN blaue Färbung geben.

2. Auf Papier wird ein Tropfen Acetaldehyd gebracht und mit einem Tropfen von Natriumnitroprussid-Lösung, dann mit überschüssiger 10%-NaOH-Lösung angetüpfelt: rotbraune Färbung, die beim Zusatz von Essigsäure verschwindet. Die Reaktion ist wenig empfindlich.

3. Ein Körnchen salzsaures Phenylhydrazin wird auf Filtrierpapier mit Aldehydlösung befeuchtet und mit einem Tropfen Diazobenzolsulfosäure versetzt. Beim Behandeln des Fleckes mit NaOH erscheint eine vorübergehende orangerote Färbung. Die Reaktion ist wenig empfindlich. Formaldehyd gibt bei dieser Probe einen violettroten Fleck.

Furfurol. Als Reagens dient die Anilinlösung in 80% Essigsäure (1 : 1). Erf.-Gr.: 0,05 γ Furfurol. Die Reaktionen mit Benzidin und β-Naphthylamin sind nicht so empfindlich. Formaldehyd, Acetaldehyd, Vanillin geben keine Färbungen mit den erwähnten Reagenzien.

Vanillin. Ein Tropfen der alkoholischen Vanillinlösung wird mit Phloroglucinlösung in konz. HCl behandelt. Es entsteht ein orangeroter, allmählich in Himbeerrot umschlagender Fleck. Erf.-Gr.: 1 γ. EUGEN SCHILOW.

Zur Methodik der Anilinbestimmung in der Luft. Von W. ALEXEEWA. *Hyg., Unfallverhüt. u. Pathol. der Arbeit (russ.). Nr. 10, 103—105 (1930).* (Staat. Inst. für Arbeitsschutz, Moskau.)

Verf. hat die Methode zur Bestimmung von Anilin mit Hilfe von Hypochlorit und Phenol bearbeitet. Zum Unterschied von ELVOVE's (Ind. Engin. Chem., 9, 952 [1917]) und CHRISTIANSEN's (ibid., II, 763 [1918]) Methoden wird die Reaktion nicht in alkalischer, sondern in neutraler Lösung ausgeführt.

5 cm^3 der zu untersuchenden Lösung werden bis zu 20 cm^3 mit Wasser verdünnt und mit 1 cm^3 1%iger Hypochloritlösung und 2 cm^3 3%iger Phenollösung versetzt und wie gewöhnlich kolorimetriert.

Die Standardlösungen muß man gleichzeitig mit den zu untersuchenden herstellen.

Nach dieser Methode kann man Anilin bei Konzentration bis zu 1 : 5,000.000 bestimmen. Der qualitative Nachweis gelingt noch bei Anilingehalt 1 : 20,000.000. Selbst bei so geringem Anilingehalt in der Luft wie 0,001 mg in 1 cm^3 genügt es, zu einer Bestimmung 50 l Luft zu aspirieren.

Zur Absorption von Anilin empfiehlt Verf. zwei mit Perlen gefüllte und je 25 cm^3 n/1-Schwefelsäure enthaltende Drechsel-Flaschen. Die Absorptionsgeschwindigkeit ist bis zu 15 l/min zulässig. EUGEN SCHILOW.

Die Bestimmung kleiner Wismutmengen in organischen Stoffen ohne deren Zerstörung. Von N. A. WALJASCHKO und P. K. WIRUP. *Ukrain. Chem. Journ., Wiss. Teil,* **5**, *275—292 (1930).*

Prinzip. Wismut wird auf einer Kupferplatte durch Verdrängung abgeschieden, in Salpetersäure gelöst und in der Lösung kolorimetrisch bestimmt.

Ausführung. 10 bis 50 g zu untersuchendes organisches Material (Organe, Mageninhalt, Blut, Harn und dergleichen) werden mit 5 cm^3 HCl (1,12) angesäuert, mit 5 cm^3 1%iger $CuCl_2$-Lösung versetzt, mit Wasser bis zu 100 cm^3 verdünnt und bis zum Sieden erwärmt. In die kochende Mischung wird eine mit Glaspapier gereinigte elektrolytische Kupferplatte von 4 cm^2 Oberfläche auf je 1 mg Bi eingetaucht und eine Stunde unter Umrühren gekocht. Man ersetzt das auskochende Wasser und beachtet, daß die Platte mit der Flüssigkeit bedeckt ist. Dann wird die Platte mit Wasser vorsichtig gewaschen und in Salpetersäure ($d = 1,2$) in der Kälte oder bei gelinder Erwärmung gelöst.

In der Lösung wird Wismut nach ROWELL's Methode bestimmt; LUNGE-BERL, Chemisch-Techn. Unters.-Methoden, 7. Aufl., II, 413; *Journ. Soc. Chem. Ind.,* **27**, *102 (1908).* Die Lösung wird mit Ammoniak bis zur Trübung, dann mit zwölf Tropfen verdünnter (1 : 2) Salzsäure (1,12) versetzt. Die trübe Flüssigkeit wird mit kochendem Wasser bis zu 60 bis 80 cm^3 verdünnt und eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Der abfiltrierte Niederschlag von Wismutoxychlorid wird in verdünnter Schwefelsäure gelöst und die Lösung mit verdünnter SO_2-Lösung und KI versetzt. Die gefärbte Flüssigkeit, welche 2 bis 10 mg Bi in 100 cm^3 enthalten muß, wird mit einer genau ebenso hergestellten Lösung von bekanntem Wismutgehalt im Kolorimeter verglichen.

Der Fehler einer einzelnen Bestimmung erreicht ± 3%.

Der Nachweis von Wismut wird in der gleichen Weise ausgeführt. Nach der Auflösung der Kupferplatte wird abfiltriertes Wismutoxydchlorid in verdünnter Schwefelsäure gelöst und mit KI-Lösung versetzt. Die gelbe bis braune Färbung weist auf Bi hin. Erf.-Gr.: 1 : 200.000.

Die Methode wurde auf den Organen eines mit Wismutsalzlösung vergifteten Kaninchens geprüft. EUGEN SCHILOW.

Zur Methodik der Milchsäurebestimmung im Harn nach Friedemann, Cotonio und Shaffer. Von R. JUDELOWITSCH. *Laboratorium-Praxis (russ.)* 7—8, *37 (1930).* (Inst. für Untersuch. der Gewerbekrankheiten, Moskau.)

Der Verfasser hat zur Bestimmung von Milchsäure im Harn die Methode von FRIEDEMANN, COTONIO und SHAFFER angewandt, welche ursprünglich zur Bestimmung von Milchsäure in Blut vorausbestimmt wurde. (*Journ. Biol. Chem.,* **73**, *335 [1927]).*

Die Isolierung von Milchsäure aus Harn wurde nach der Methode von WARKANY, *Bioch. Ztschr.*, **184**, *474 (1927)*, ausgeführt. Die Resultate sind sehr gut.

EUGEN SCHILOW.

Die vergleichende Schätzung einiger Methoden zum Nachweis von Blut im Harn. Von F. J. BERENSTEIN. *Laboratorium-Praxis, (1930), Nr. 10, 6—7.* (Ukrain. Psychonevrol. Inst., Charkow.)

Fünf verschiedene Verfahren zum Nachweis von Blut im Harn wurden verglichen.

Die Empfindlichkeit der HELLER'schen Probe (1 : 5000) ist nicht genügend für klinische Zwecke. Die Guajak-, Pyramidon-, Benzidinproben haben höhere Empfindlichkeitswerte (1 : 10.000, bezw. 1 : 20.000, bezw. 1 : 25.000). Doch haben alle drei Reaktionen den Nachteil, das positive Resultat in Anwesenheit von Jodiden zu geben. Die Phenolphthaleinprobe von KASTLE-MEYER ist die empfindlichste, da sie Blut im Harn noch in Konzentration 1 : 150.000 bis 1 : 250.000 nachweist. Für wäßrige Blutlösungen ist die Empfindlichkeit noch höher — etwa 1:10,000.000. Die Phenolphthaleinprobe wird auch durch Jodide nicht vertauscht; sie ist also am geeignetsten zum Nachweis von Blut im Harn. EUGEN SCHILOW.

Über die Bestimmung des Kaliums im Blut. Eine modifizierte Bestimmungsmethode. Von REBECA GERSCHMAN und A. D. MARENZI. *Anales de Farmacia y Bioquimica.* 2, *194—204 (1931).* (Buenos-Aires, Medizinische Fakultät, Physiologisches Institut.)

Prinzip der Methode: Aus den Filtraten von der Enteiweißung mit Trichloressigsäure wird das Kalium unter definierten Bedingungen als Kaliumkobaltnitrit gefällt. Das Kobalt wird dann mit Hilfe der VOGEL'schen Reaktion kolorimetrisch bestimmt.

Benötigte Lösungen:

Natrium-Kobaltnitrit. 1 g eines reinen Präparats wird in 5 ccm 1%iger Essigsäure gelöst.

Kobalt-Vergleichslösung. Da Kobaltchlorür hygroskopisch ist, müssen die Vergleichslösungen durch Titration des Chlors kontrolliert werden.

Ausführung: Von dem mit 10%iger Trichloressigsäure enteiweißten Serum oder Plasma entnimmt man eine Menge, die etwa 0,20 mg Kalium enthält und neutralisiert die Probe mit 10%iger (kaliumfreier) Natriumcarbonatlösung (ein Tropfen Methylrotlösung als Indikator, Überschuß an Natriumcarbonat vermeiden!), dann füllt man in einem Zentrifugenglas (15 ccm Inhalt) auf 3 ccm auf und gibt tropfenweise 3 ccm Natriumkobaltnitrit zu. Nach mindestens vierstündigem Stehen wird 45 Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert und in der Zentrifuge zweimal mit je 5 ccm Wasser gewaschen. Dann löst man den Niederschlag in 0,1 ccm konzentrierter Salzsäure (nötigenfalls in der Wärme), gibt 1 ccm Wasser zu, dann (genau in der angegebenen Reihenfolge) 0,25 ccm 60%ige Ammoniumacetatlösung, 0,25 ccm 25%ige Kaliumnatriumtartratlösung (die Zugabe der Tartratlösung verhindert die Störung der Kobaltreaktion durch gleichzeitig anwesendes Eisen) und 0,5 ccm einer gesättigten Ammoniumrhodanidlösung. Man mischt gut und gibt 10 ccm eines Gemisches aus gleichen Teilen Äther und Amylalkohol zu. Beim Schütteln geht das Kobaltrhodanid in die Amylalkohol-Äther-Schicht über. Zu gleicher Zeit wird eine 0,2 mg Kalium entsprechende Menge der Kobalt-Vergleichslösung mit denselben Reagenzien versetzt. Die Intensität der erhaltenen Färbungen wird im Kolorimeter verglichen. Die Methode ist auf 3% genau.

WILLSTAEDT.

Bestimmung von Magnesium mittels 8-Oxychinolin. Von HUGO FREDHOLM. *Svensk Kemisk Tidskrift*, **44**, *79—85 (1932)*. (Lund, Universität, Labor. f. anorgan. Chem.)

Das Magnesium wird nach BERG (Journ. f. prakt. Chem., **115**, 178 [1927]; Ztschr. anal. Chem., **70**, 341; **71**, 23 [1927]) mit 8-Oxychinolin gefällt. Die Fällung wird dann in Salzsäure wieder gelöst. In der Lösung wird dann das Oxychinolin durch Titration mit Bromat-Bromid bestimmt (8-Oxychinolin geht dabei in 5,7-Dibrom-8-oxy-chinolin über). Die Arbeitsweise des Verfassers ist gegenüber der von BERG (Pharm. Z., **71**, 1542 [1926]) und von KOLTHOFF (Pharm. Monatshefte, 8, September 1927) etwas abgeändert.

Ausführung: Die neutrale Lösung, die nicht mehr als 25 mg Magnesium enthalten soll, wird auf 100 ccm verdünnt und auf 90—100° erwärmt. Dann gibt man 2—3 g festes Ammoniumchlorid und tropfenweise eine 1%ige alkoholische Lösung von Natrium-8-oxychinolinat (hergestellt durch Lösen von 1 g 8-Oxychinolin in 100 ccm 0,1 n. Natronlauge) in schwachem Überschuß hinzu. Man kocht 3 bis 4 Minuten und läßt erkalten. Dann filtriert man (Jenaer Glasfiltertiegel G 3 7), wäscht sorgfältig mit schwach ammoniakalischem warmen Wasser aus, führt den Filtertiegel samt der Fällung in einen Kolben über und löst den Niederschlag in warmer 2 n. Salzsäure. Der Tiegel wird dann sorgfältig abgespült und entfernt. Zur erhaltenen salzsauren Lösung gibt man einige Gramm Kaliumbromid und einige Tropfen einer 0,2%igen Methylrotlösung. Dann titriert man mit 0,1 n. Kaliumbromatlösung bis zum Umschlag nach Gelb. Nun gibt man etwas festes, jodatfreies Kaliumjodid hinzu und titriert das ausgeschiedene Jod mit Thiosulfat zurück.

Die Methode gibt auch bei kleinen Mengen (2—10 mg) vorzügliche Resultate. Von anderen Ionen stört nur Calcium, falls es in großer Menge vorhanden ist.

WILLSTAEDT.

BÜCHERSCHAU.

Fortschritte der Biochemie. II. (1924—1931). Von Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. FELIX HAUROWITZ, Professor für physiologische Chemie an der Deutschen Universität Prag. Band 26 der „Wissenschaftl. Forschungsberichte". 152 Seiten. Dresden 1932, Theodor Steinkopff. Geh. 11 RM, geb. 12 RM.

Das Buch bildet die Fortsetzung des im Jahre 1925 veröffentlichten ersten Teiles und berichtet über die in den Jahren 1924 bis 1931 erzielten Fortschritte auf dem gesamten Gebiete der Biochemie. Das behandelte Material weist folgende Gruppeneinteilung auf: Materie, Strahlung und chemische Kräfte; Elektrolyte und Mineralstoffe; Phasengrenzen (Membranen); Katalyse und Enzyme; Konstitution der Kohlehydrate; Glykogen und Oxydation der Kohlehydrate; Chemie der Muskelkontraktion; das Eiweißmolekül; Eiweißabbau; Nukleinsäuren und ihre Derivate; Blutfarbstoff und verwandte Farbstoffe; Immunitätsreaktionen; Fette, Phosphatide, Zerebroside; Sterine, Gallensäuren und Vitamin D; Isoprenderivate, Carotinoide und Vitamin A; Hormone und Vitamine unbekannter Zusammensetzung; biochemische Methodik. Innerhalb der Kapitel ist alles untergebracht, was in jedem einzelnen Gebiet der biochemischen Disziplinen an Neuem in den Berichtsjahren gearbeitet wurde. Der der allgemeinen Atom- und Molekülchemie etwas ferner stehende Biochemiker wird für die außerordentlich klare und übersichtliche Darstellung des bezüglichen schwierigen Stoffes dankbar sein. Eine ebenso verläßliche und kritische, nicht einfach referierende, vor allem auch lückenlose Behandlung erfährt jedes Spezialgebiet der Biochemie. Da in unserer wissenschaftlich so ungemein fruchtbaren Zeitperiode die größeren Hand- und Lehrbücher in jedem Fache naturgemäß bald in manchen Richtungen versagen müssen, so bilden Sammelberichte wie der vorliegende die unerläßliche Ergänzung zur Handbuchliteratur. Der Bericht von HAUROWITZ ist jedem an der Biochemie Interessierten als zuverlässiger Führer durch die wissenschaftlichen Neuerscheinungen biochemischen Inhalts bestens zu empfehlen. R. WASICKY.

Stufenphotometrische Absorptionsbestimmungen in der medizinischen Chemie. Von CARL URBACH. (Sammlung: Monographien aus dem Gesamtgebiete der Mikrochemie, I.) Verlag Emil Haim & Co., Wien und Leipzig, 1932. VIII, 131 Seiten, 46 Textabb. und 28 Tabellen. Preis geh. RM 10·—, geb. RM 11·60.

Die „Kolorimetrie ohne Vergleichslösung", wie die stufenphotometrischen Absorptionsbestimmungen auch bezeichnet werden, ermöglicht ein wesentlich genaueres und vielfach auch müheloseres Arbeiten, als dies bei den bisher üblichen kolorimetrischen Verfahren der Fall war. Vor allem aber werden jene kolorimetrischen Bestimmungsverfahren auf eine einwandfreie Basis gestellt, die bisher nur mit Hilfe empirisch geeichter Farbstofflösungen durchgeführt werden konnten. Eine übersichtliche, in nicht zu großem Umfange gehaltene Zusammenfassung des Methodischen dieser Bestimmungsverfahren wie auch der wichtigsten, bereits ausgearbeiteten quantitativen Bestimmungen fehlte bis jetzt, so daß schon aus diesem Grunde allein das Buch C. URBACH's wärmstens zu begrüßen ist. Dabei hat es der Autor verstanden, das wirklich Wesentliche auch für den auf diesem Gebiete ganz Unerfahrenen in ausgezeichneter Weise darzustellen. Von den in der medizinischen Chemie mit Hilfe des PULFRICH'schen Stufenphotometers bisher ausgearbeiteten Bestimmungsmethoden stammt eine stattliche Anzahl von C. URBACH, dessen reiche Erfahrung auf diesem Gebiete deutlich aus der vorliegenden Monographie spricht.

Im allgemeinen Teil, der die notwendigsten theoretischen Kenntnisse vermittelt, beschreibt der Autor zuerst die Apparatur und bespricht dann die Grundlagen der photometrischen Messung (Wirkung der Spektralfilter, Absorptionsgesetz, Einstellgenauigkeit und Meßgenauigkeit) sowie die eigentliche Ausführung der photometrischen Messung (Aufbau der Apparatur, Wahl des Filters, Einstellung und Ablesung, Messung nach der Schichthöhenmethode, Bestimmung des Extinktionskoeffizienten). Die einzelnen Bestimmungsverfahren enthalten außer der genauen Arbeitsvorschrift auch die entsprechenden Eichkurven und Tabellen, die es ermöglichen, bei Verwendung des angegebenen Filters und bestimmter Schichtdicken den Gehalt des betreffenden Stoffes ohne weitere Rechnung feststellen zu können. Von speziellen Bestimmungsmethoden, die durch ein ausführliches Literaturverzeichnis ergänzt werden, enthält das Buch die Messung der Harn- und Serumfarbe, die quantitative Bestimmung des Acetons, des Gesamt-, anorganischen und organischen Phosphors, des Kalziums und Magnesiums im Harn, der Harnsäure, des Bilirubins, Urobilins und Urobilinogens im Blutserum, des Rhodans und des Cholesterins in verschiedenen Körperflüssigkeiten sowie die Bestimmung der Blutmenge nach GRIESBACH, die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration und die Darstellung optisch identischer Lösungen verunreinigter Farbstoffe. Aus dieser Inhaltsübersicht kann man bereits ersehen, daß es sich hier nicht nur um Bestimmungen handelt, die allein den medizinischen Chemiker interessieren; auch für andere Gebiete der Chemie lassen sich daraus Anregungen schöpfen.

Die stufenphotometrischen Absorptionsbestimmungen stellen jedenfalls durch ihre Exaktheit und die Möglichkeit, kleinste Mengen der verschiedensten Substanzen mit einer sonst nicht erreichbaren Genauigkeit zu erfassen, ein derart ausgezeichnetes Hilfsmittel für den Mikroanalytiker dar, daß die Monographie von C. URBACH ganz besonders den Mikrochemikern zur Einarbeitung auf diesem Gebiete wärmstens empfohlen werden kann. L. FUCHS.

Wörterbuch der Chemie. Von WILLY H. THUROW, Mitglied des Franklin-Instituts, Philadelphia. I. Teil (Englisch-Deutsch), VII und 261 S., geb. RM 13·—. II. Teil (Deutsch-Englisch), XII und 298 S., geb. RM 14·—. Verlag Dr. A. Tetzlaff, Berlin-Schöneberg 1929 bezw. 1931.

Der in diesem Jahre erschienene II. Teil ist die Ergänzung des 1929 herausgegebenen englisch-deutschen Wörterbuches des gleichen Autors; er ist in ebenso übersichtlicher und handlicher Form gehalten wie der I. Teil, der in der gesamten Fachpresse eine überaus freundliche Aufnahme gefunden hat. Dem Verfasser ist es in bester Weise gelungen, die wichtigsten Fachausdrücke (jeder der beiden Teile enthält mehr als 1700 Stichwörter) aus allen Gebieten der reinen und angewandten Chemie in solcher Weise anzuordnen, daß ein schnelles Zurechtfinden möglich ist. Bei der zunehmenden Bedeutung der angelsächsischen Fachliteratur wird das Wörterbuch der Chemie von THUROW als ebenso willkommenes als unentbehrliches Hilfsmittel in keiner Laboratoriumsbibliothek fehlen dürfen. F. FEIGL.

Beimengungen und Verunreinigungen in Metallen *(Impurities in Metals).* Ihr Einfluß auf Gefüge und Eigenschaften. Von C. J. SMITHELLS. Erweiterte deutsche Bearbeitung von W. HESSENBRUCH. VI, 246 Seiten und 248 Textabbildungen. Verlag Julius Springer, Berlin 1931. Lwd. RM 29·—.

Zahlreiche Forschungsergebnisse der jüngeren Zeit haben gezeigt, daß verschiedene Eigenschaften metallischer Werkstoffe durch ganz geringe Beimengungen wesentlich beeinflußt werden können. Für die in Frage stehende Wirkung ist es vollkommen gleichgültig, ob es sich um absichtliche oder unabsichtliche Beimengungen, bezw. Verunreinigungen handelt. Derartige Erfahrungen und Beobachtungen waren bisher in einzelnen Originalarbeiten verstreut, und es ist daher ein Verdienst SMITHELLS, diese Erfahrungen in Buchform zusammengestellt und dadurch eine Lücke in der fachkundlichen Literatur ausgefüllt zu haben. Die englische Fassung wurde von HESSENBRUCH übersetzt und erweitert. Da die bisherigen Arbeiten noch nicht hinreichen, um Gesetzmäßigkeiten oder Theorien aufzustellen, bringt das Buch eine umfangreiche Sammlung des bisher Geleisteten, nach bestimmten Gesichtspunkten gegliedert.

Im theoretischen Teil werden, von reinen Metallen ausgehend, die Einflüsse auf das Gefüge und Eigenschaften derselben besprochen. Dieser Besprechung schließt sich eine eingehende Behandlung der Bestimmungsverfahren von Beimengungen in Metallen an, und zwar die chemischen, physikalischen und metallographischen Verfahren. Für die Bestimmung kleiner Beimengungen, die oft nur in einigen Hundertstel Prozenten und noch weniger vorliegen können, steht es kaum außer Zweifel, daß eine sinngemäße Anwendung mikrochemischer Methoden zur Lösung bestimmter Probleme beitragen werden. Auf solche chemische Verfahren, die sich nur mit der Erkennung und Bestimmung kleiner Stoffmengen befassen, findet man nur einen ganz kurzen Hinweis, mit dem der Verfasser wohl der Bedeutung der vor allem von F. EMICH begründeten mikrochemischen Methoden speziell für die in Frage stehenden Probleme nicht gerecht wird.

Im folgenden praktischen Teil werden in fünf Abschnitten der Einfluß der Beimengungen auf die Struktur, mechanischen, physikalischen (wie Wärmeausdehnung), elektrischen und magnetischen Eigenschaften und Korrosion behandelt. In jedem Falle wird die Wirkung der Beimengungen gegliedert und nach metallischen, nichtmetallischen und gasförmigen Beimengungen besprochen. Das in diesen Abschnitten zusammengestellte Material ist überaus reichhaltig und viele Hinweise auf die entsprechenden Originalarbeiten ermöglichen ein eingehendes Studium.

Trotz der bei den chemischen Verfahren aufgezeigten Unvollständigkeit kann das Urteil über den Wert des ausgezeichneten Buches nicht beeinflußt werden. Das Buch stellt eine sehr willkommene und wertvolle Neuerscheinung dar und muß als erste Zusammenfassung der bisherigen Arbeiten in diesem Gebiete der Metallkunde gewertet werden. Es kann jedem Fachmann, der sich mit diesen Problemen zu befassen hat, bestens empfohlen werden. M. NIESSNER.

Microchemical Laboratory Manual. By FRIEDRICH EMICH. With a section on Spot Analysis by FRITZ FEIGL. Translated by FRANK SCHNEIDER. New York, John Wiley & Sons. Inc. — London: Chapman & Hall, Ltd. 1932. XVI, 180 ps. Price $ 3.—.

Der Verlag John Wiley & Sons, New York, bringt Prof. EMICH's bekanntes Buch „Mikrochemisches Praktikum" (Verlag Bergmann in München, 2. Aufl., 1930), in die englische Sprache übersetzt von FRANK SCHNEIDER. Das Erscheinen dieses Buches wird allseits freudig begrüßt werden, ist es doch ein weiterer Beweis für die rastlos fortschreitende Entwicklung der Mikrochemie und des ständig wachsenden Interesses für dieses Sondergebiet der wissenschaftlichen Forschung. EMICH's Untersuchungen bildeten die Grundlage für die Entwicklung der mikrochemischen Methoden, insbesondere für die Schöpfung der quantitativen organischen Mikroanalyse durch FRITZ PREGL. Das Buch EMICH's, welches in klarer und übersichtlicher Darstellung die Methoden der anorganischen Mikroanalyse bringt, erfährt durch einen von F. FEIGL verfaßten Abschnitt über Spurensuche eine wertvolle Ergänzung. Von allgemeinem Interesse sind vor allem die Methoden der experimentellen und präparativen Mikrochemie, die unabhängig von den analytischen Methoden das Rüstzeug für jede Art mikrochemischer Forschung und mikrochemischer Arbeit bilden. Gerade diese Methoden sind berufen, dem Buche über die Grenzen der Mikroanalytik hinaus den Zutritt in jede wissenschaftliche Forschungsstätte zu erschließen. Durch das „*Microchemical Laboratory Manual*" werden nun weitere Kreise der amerikanischen und englischen Gelehrtenwelt mit dem Werke Prof. EMICH's bekannt, und es ist nur zu wünschen, daß es sich dort ebensoviel Freunde wirbt und Anregung für mikrochemische Forschung gibt wie in seiner deutschen Heimat. A. FRIEDRICH.

VARIA.

MICRO CHEMISTRY AT NEW YORK UNIVERSITY.

With the celebration of the one hundreth anniversary of the founding of New York University, it seems appropriate to give an account also of the contributions of this institution in the field of micro chemistry.

The late Professor JOHN A. MANDEL, of the University and Bellevue Hospital Medical College of New York University, appreciated at an early stage of their development the evergrowing importance of micro-chemical methods. With the splendid developments of the clinical minimetric methods in America it was quite natural that Prof. MANDEL should first center his attention upon the application and teaching of these methods for medical diagnosis. His experience in the micro biochemical-, physiological- and pathological field were then compiled in his work (in association with H. STEUDEL) "Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung" ("Minimetric methods of blood analysis")[1]. This work rendered a valuable service to medicine providing a complete and concise procedure for the quantitative determination of some fourteen constituents in a sample of from seven to ten ccm. blood, and helped to a great extent the introduction abroad of these excellent methods, largely of American origin.

Not only was Prof. MANDEL himself active in the micro chemical field, but his former coworkers and associates, the Professors WM. C. MACTAVISH, A. O. GETTLER, CLAUS F. HINCK and J. MUNSON, took an active interest in this branch of science. This group made noteworthy contributions in the application of these methods to problems in physiology and pathology[2–7] and also in the teaching of them to medical students. In this way valuable service to the dissemination of the knowledge of micro chemistry was rendered.

---

[1] J. A. MANDEL and H. STEUDEL, Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung, 2nd Edition, Walter de Gruyter and Co., Berlin and Leipzig, 1924.

With the development of the micro chemical methods (milligram processes) by the late Prof. F. PREGL in the organic chemical field and by Prof. F. EMICH in the inorganic field, Prof. MANDEL already a pioneer in the field of clinical micro chemistry, became one of the first to bring the necessary apparatus and equipment to the American shores.

Realizing the necessity of first hand information in this branch of science, Prof. MANDEL recommended his former assistant and coworker JOSEPH B. NIEDERL, to Prof. PREGL for more thorough studies in this field. After a year of work in the institute of Prof. PREGL, J. B. NIEDERL introduced in September 1925 the quantitative organic micro chemical methods in New York University, Washington Square College. The interest created and fostered by Prof. MANDEL was continued by Prof. MACTAVISH, resulting in the continued expansion of the micro chemical laboratory at this institution.

In 1929 A. A. BENEDETTI-PICHLER, former coworker of Prof. EMICH was added to the staff. At present both fields, the organic and the inorganic, are combined under the joint supervision of Prof. NIEDERL and Dr. PICHLER.

In 1928 the conventional methods of organic macro elementary analysis had been superseded by equivalent micro method and graduate courses in this field under the supervision of Prof. NIEDERL were instituted at the Washington Square College of New York University. In 1930, instruction in the inorganic micro chemical methods was added to the curriculum of the Washington Square College. This course is under the direction of BENEDETTI-PICHLER.

---

[2] A. O. GETTLER, Journ. Biol. Chem., 42, 311 (1920).

[3] A. O. GETTLER, ibid., 29, 47 (1917).

[4] A. O. GETTLER, Journ. Am. Med. Assoc., 77, 1650 (1921).

[5] A. O. GETTLER, Journ. Pharm. and Exp. Therapeutics, 21, 161 (1923).

[6] A. O. GETTLER and A. TIBER, Arch. Path. and Lab. Med., 3, 75, 218 (1927).

[7] A. O. GETTLER and R. OPPENHEIMER, Arch. Internal Med., 23, 235 (1919).

In the field of inorganic micro chemistry, the contributions by Dr. PICHLER and his coworkers[8–12], Dr. HILDE THURNWALD (ROCKEFELLER fellow 1930-1931) and Mr. FRANK SCHNEIDER deal among others with quantitative determinations of certain elements present in beryllium silicate rocks. This work resulted in the development of consecutive quantitative gravimetric separations and determinations of several elements in one single sample of a few milligram in weight. Other publications of this group deal with a micro test for zinc and the development of an ingenious micro fractionation method, whereby extremely small amounts of a volatile constituent are isolated from a large amount of solvent.

Research in the application of photoelectric methods of measurement to micro chemistry was performed by Profs. MUELLER[13, 14], PARTRIDGE, Drs. SMITH[15] and WILLIAMS, resulting in contributions of value to both the organic and the inorganic field. Micro potentiometric determinations of reducing sugars[16] and of other substances were also carried out. Prof. H. MOUQUIN[17] and Dr. S. NATELSON elaborated an application of micro technique to surface tension measurement.

In the field of organic micro chemistry, under the supervision of Prof. NIEDERL and with the cooperation of Prof. TRAUTZ, Messrs. SASCHEK, SILBERT, MEADOW and WHITMAN several con-

---

[8] A. A. BENEDETTI-PICHLER, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **2**, 309 (1930).

[9] A. A. BENEDETTI-PICHLER and F. SCHNEIDER, Mikrochemie, EMICH-Festschrift, 1 (1930).

[10] H. THURNWALD and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Mikrochemie, **IX**, 324 (1931).

[11] H. THURNWALD and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Ztschr. analyt. Chem., 86, 41 (1931).

[12] A. A. BENEDETTI-PICHLER and F. SCHNEIDER, ibid., 86, 69 (1931).

[13] A. WILLIAMS, R. H. MUELLER and J. B. NIEDERL, Mikrochemie, **IX**, 269 (1931).

[14] R. H. MUELLER, ibid., **X**, 285 (1931).

[15] R. A. SMITH, Am. Medicine, **27**, 3 (1932).

[16] J. B. NIEDERL and R. H. MUELLER, Journ. Amer. chem. Soc., **51**, 1356 (1929).

[17] H. MOUQUIN and S. NATELSON, Journ. physic. Chem., **35**, 1931 (1931).

tributions have been made, among them[18–20] a new micro vapor density method[21] leading further to a method for the determination of the boiling point of small amounts of material. In quantitative organic elementary analysis, the micro DUMAS method was studied[22–25] and several improvements inaugurated. An ultra micro method for the quantitative determination of carbon and hydrogen in samples of half a milligram and less[26] and one for the determination of the same elements in an atmosphere of nitrogen were advanced, introducing several novel features.

Cooperation of Profs. GETTLER, NIEDERL and PICHLER made possible, the final solution of an important micro analytical problem, namely the actual isolation and identification of ethyl alcohol in normal human and animal tissues[27–29].

For the dissemination of the micro chemical methods outside the University, a number of lectures were given by Profs. NIEDERL, PICHLER and GETTLER. In addition to the lectures given before certain groups in the faculty and the students in Washington Square College, the following lectures were given dealing with the field of inorganic-and organic micro chemistry, as well as of certain special phases in this branch of science:

Brooklyn Polytechnic Institute, Brooklyn, N. Y.:
Dec. 14, 1929: J. B. NIEDERL,
Jan. 7, 1930: A. A. BENEDETTI-PICHLER.

Museum of Natural History, New York, N. Y.:
March 20, 1930: J. B. NIEDERL and A. A. BENEDETTI-PICHLER.

---

[18] J. B. NIEDERL and E. P. SILBERT, Journ. Amer. chem. Soc., **51**, 376 (1929).

[19] J. B. NIEDERL, ibid., **51**, 474 (1929).

[20] J. B. NIEDERL and J. B. WHITMAN, Ztschr. analyt. Chem., **86**, 65 (1931).

[21] J. B. NIEDERL, ibid., **77**, 169 (1929).

[22] J. B. NIEDERL, O. TRAUTZ and W. SASCHEK, Mikrochemie, EMICH-Festschrift, 219 (1930).

[23] O. R. TRAUTZ and J. B. NIEDERL, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **3**, 151 (1931).

[24] WM. J. SASCHEK, ibid., **3**, 198 (1931).

[25] O. R. TRAUTZ, Mikrochemie, **IX**, 300 (1931).

[26] J. B. NIEDERL and J. R. MEADOW, ibid., **IX**, 350 (1931).

[27] A. O. GETTLER, J. B. NIEDERL and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Journ. Amer. chem. Soc., **54**, 1476 (1932).

[28] A. O. GETTLER and J. B. NIEDERL, Ztschr. angew. Chem., **44**, 457 (1931).

[29] A. O. GETTLER and A. A. BENEDETTI-PICHLER, ibid., **44**, 458 (1931).

Atlanta meeting of the American Chemical Society, Atlanta, Ga.:
April 8, 1930: J. B. NIEDERL and A. A. BENEDETTI-PICHLER.
Vienna meeting of the Verein Deutscher Chemiker, Vienna, Austria:
May 29, 1931: J. B. NIEDERL and A. A. BENEDETTI-PICHLER.
Buffalo meeting of the American Chemical Society, Buffalo, N. Y.:
Sept. 2, 1931: A. O. GETTLER.
Rochester section of the American Chemical Society, Rochester, N. Y.:
Jan. 4, 1932: J. B. NIEDERL and A. A. BENEDETTI-PICHLER,
Feb. 1, 1932: A. O. GETTLER.

Most of the research work performed in the field of micro chemistry by some of the members of the Department of Chemistry of Washington Square College, New York University, in the centennial years 1931—1932 is presented in this issue of the MIKROCHEMIE not only in celebration of the centennial, but also to honor the memory of Prof. JOHN A. MANDEL.

Hofrat Prof. Dr. H. Molisch, em. Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien, ist in den Redaktionsstab der MIKROCHEMIE eingetreten.

Referate in der Mikrochemie. Ab Band XII der Zeitschrift MIKROCHEMIE wird an Stelle der bisherigen Einzelreferate über Arbeiten mikrochemischen Inhaltes lediglich unter Angabe des Titels und des Erscheinungsortes über neuerschienene mikrochemische Arbeiten berichtet werden. Die Referenten für die einzelnen Gebiete sind:

1. Chemische Arbeiten: Hofrat Prof. Dr. F. Emich.
2. Pflanzenphysiologische Arbeiten: Hofrat Prof. Dr. H. Molisch.
3. Medizinisch-chemische Arbeiten: Prof. Dr. R. Wasicky.

Verleihung des Fritz-Pregl-Preises für 1932. „Die Akademie hat beschlossen, den Preis in der Höhe von eintausend Schilling an **Dr. Moriz Niessner,** Assistenten der Technischen Hochschule in Wien, für seine Arbeiten über mikroanalytische Untersuchungen von Legierungen zu verleihen.

DR. NIESSNER hat eine einfache und wertvolle Methodik zum Nachweis von Inhomogenitäten in Legierungen ausgearbeitet.“

(Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Wien,
mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, 1932, Nr. 14.)

Dr. A. Mayrhofer, Privatdozenten an der Medizinischen Fakultät der Universität Wien, wurde der Titel eines a. o. Professors verliehen.

Sachverständigenbefugnis für Mikrochemie und Mikroanalyse. „Das Handelsgericht in Wien hat die Sachverständigenbefugnis des Privat- und Honorardozenten Dr. R. Strebinger für die Gruppe LXI/3 Chemisch-technologische Untersuchungen auf „Untersuchung kleinster Stoffmengen“ erweitert. Dadurch ist auch dem Gebiete der Mikrochemie und Mikroanalyse Rechnung getragen.“
(Österr. Chem. Ztg. Nr. 8, 1932.)

Die ACHEMA VII, Ausstellung für chemisches Apparatewesen, veranstaltet von der DECHEMA, Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen (Hauptgeschäftsstelle: Seelze bei Hannover), ist für 1933 (voraussichtlich vom 2. bis 11. Juni) in Köln, gleichzeitig mit der Hauptversammlung des Vereines deutscher Chemiker, der Deutschen Kautschuk-Gesellschaft, der Deutschen Brennkrafttechnischen Gesellschaft und der DECHEMA, Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen, geplant. Weitere wissenschaftliche, bezw. wirtschaftliche Vereine und Verbände haben die Abhaltung einer Versammlung während der ACHEMA VII in Aussicht gestellt.